

Die Rolle der Mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore bei der Entstehung des myokardialen Reperfusionsschadens

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Maher Said
aus Jerusalem
Gießen 2014

Aus dem Physiologischen Institut
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Rainer Schultz

Gutachter: Prof. Dr. Dr. H.M. Piper
Gutachter: Prof. Dr. Dr. V. Alt
Gutachter: Prof. Dr. W. Kummer

Tag der Disputation : 30.01.2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

1. EINLEITUNG

- 1.1. Der akute myokardiale Reperfusionsschaden
- 1.2. Pathophysiologische Vorgänge während der Ischämie
- 1.3. Mechanismen des Reperfusionsschadens
- 1.4. Die Rolle der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore
- 1.5. Hypothese
- 1.6. Ziele der Arbeit
- 1.7. Modell der simulierten Ischämie und Reperfusion an isolierten Kardiomyozyten

2. MATERIAL

- 2.1. Chemikalien
- 2.2. Häufig verwendete Puffer und Medien
 - 2.2.1. Zellkulturmedien
 - 2.2.2. Perfusionsmedien
- 2.3. Geräte und Laborbedarf
 - 2.3.1. Zellkultur und Herzmuskelzellisolierung
 - 2.3.2. Fluoreszenzmessungen
 - 2.3.3. Anoxie-Reoxygenationsexperimente
 - 2.3.4. Weitere Geräte
 - 2.3.5. Verbrauchsmaterialien

3. METHODEN

- 3.1. Herzmuskelzellisolierung
 - 3.1.1. Versuchstiere
 - 3.1.2. Herzmuskelzellpräparation
- 3.2. Zellkultur

3.3. Anoxie-Reoxygenations-Experimente

3.3.1. Versuchsaufbau

3.3.2. Fluoreszenzmikroskopische Messungen zur Ermittlung der intrazellulären Kationenhomöostase

3.3.3. Ermittlung der intrazellulären und mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration mittels des Fluoreszenzindikators Fura-2-AM

3.3.4. Detektion der MPTP-Öffnung

3.3.5. Messung des mitochondrialen Membranpotentials mit JC-1

3.3.6. Experimentelles Protokoll

3.3.7. Messparameter

3.4. Statistik

4. ERGEBNISSE

4.1. MPTP-Öffnung während simulierter Ischämie und Reperfusion

4.2. Der Einfluss des sarkoplasmatischen Retikulums auf die MPTP-Öffnung

4.3. Die Rolle der mitochondrialen Ca^{2+} -Überladung bei der MPTP-Öffnung

4.4. Das zytosolische Ca^{2+} während der Reperfusion

4.5. Zellkontraktur

5. DISKUSSION

6. ZUSAMMENFASSUNG

7. SUMMERY

8. LITERATUR

9. ERKLÄRUNG

10. DANKSAGUNG

11. LEBENSLAUF

Abkürzungen

Abb	Abbildung
AM	Acetoxymethylester
ANT	Adenin-nukleotid-Translokase
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BDM	2,3-Butanedione monoxime
°C	Grad Celcius
Ca.	Zirka
Ca ²⁺	Calcium-Ionen
CaCl ₂	Calciumchloride
CCD Kamera	Charge-Coupled Device Kamera
CCT	Kreatin-Karnitin-Taurin
CoCl ₂	Cobaltchloride
Csp A	Cyclosporin A
CyP-D	Cyclophilin D
et. al.	Und andere
FCS	Fetales Kaelberserum
Fura-2	Polyamino Carboxylic Acid
g	Gramm
H ⁺	Wasserstoff-Ionen
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N-2-Ethansulfonsaeure
IU/ml	Internationale Einheit pro milliliter (International Units pro Liter)
JC-1	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'- Tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide
Kap	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Kont	Kontrolle
M	Mol/Liter

MCU	mitochondrialer Ca^{2+} -Uniporter
MgSO_4	Magnesiumsulfat
min	Minute
mm	Millimeter
mM	Millimol/Liter
ml	Milliliter
ml/min	Milliliter/Minute
Mn	Mangan
MnCl_2	Manganchlorid
MnSOD	Mangan Superoxiddismutase
MPTP	mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore(n)
mV	Millivolt
μM	Mikromol/Liter
μl	Mikroliter
N_2	Stickstoff
Na^+	Natrium-Ionen
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO_3	Natriumbicarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NHE	Sarkolemmaler Na^+/H^+ -Austauscher
nm	Nanometer
Norm	Normoxie
l	Liter
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
pH	Nigativer dekadischer Logarithmus der H^+ -Konzentration
r.E.	Relative Einheiten
OxPhos	oxidative Phosphorylierung
Reox	Reoxigenation
RM NCX	$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher
RyR	Ca^{2+} -Freisetzungskanal des sarkoplasmatischen Retikulums
ROS	Reaktive Sauerstoff-Spezies
s	Sekunde
SEM	Standardabweichung des Mittelwerts

SERCA	Ca ²⁺ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
SR	Sarkoplasmasches Retikulum
ST	Kurvenabschnitt des Elektrokardiogramms (vom Ende des QRS-Komplexes bis zum Anfang der T-Welle)
STEMI	ST-Elevation Myocardial Infarction
$\Delta\Psi$	Membranpotential
%	Prozent
% (vol/vol)	Volumenprozent
VDAC	spannungsgesteuerter Anionenkanal der MPTP
vs.	Versus (gegenübergestellt)

1. Einleitung

1.1 Der akute myokardiale Reperfusionsschaden

Der myokardiale Reperfusionsschaden bezeichnet den Gewebeuntergang, der im Rahmen einer Reperfusion von den Herzmuskelzellen nach einer Ischämie stattfindet. Für lange Zeit wurde der in der Reperfusion beobachtete Schaden als alleinige Folge der Ischämie angesehen. Die Forschungsarbeiten der letzten Jahre zeigen jedoch, dass die Ischämie an diesem Gewebeschaden nur zum Teil beteiligt ist und dass die Reperfusion selbst dem Myokard einen zusätzlichen Schaden zufügt (Piper et al. 2004, 2008, Garcia-Dorado et al. 2004, Skyschally et al. 2008). Ein Beleg dafür ist, dass zusätzliche Interventionen mit bestimmten Pharamaka wie Cyclosporin A oder die ischämische Postkonditionierung während der Reperfusion zur Verminderung dieses Gewebsschadens und zur Verbesserung der kardialen Pumpfunktion führen können (Thibault et al. 2008, Piot et al 2008, Staat et al. 2005).

In Tierexperimenten ist bereits seit längerem belegt, dass man die Infarktentwicklung in der frühen Reperfusionsphase günstig beeinflussen kann. In diesem Kontext wird aus mehreren Studien immer deutlicher, dass die Öffnung der MPTP bei der Entwicklung des myokardialen Reperfusionsschadens beitragen kann (Gateau-Roesch et al. 2006), und dass die Hemmung ihrer Öffnung in der Frühphase der Reperfusion zur Verhinderung des Reperfusionsschadens und dadurch zur Reduktion der Infarktgröße (Halestrap et al. 2004, Housenloy et al. 2003, Nakagwa et al. 2005) führen kann.

Am menschlichen Herzen wurde bereits gezeigt, dass die Infarktentwicklung in der Frühphase der Reperfusion ein wichtiges therapeutisches Ziel darstellt (Piot et al. 2008). In dieser Studie wurde gezeigt, dass die Gabe von dem spezifischen Hemmer der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Poren Cyclosporin A während der Reperfusionstherapie eines akuten Myokardinfarktes zur Reduktion der Infarktgröße und zur Verbesserung der Pumpfunktion führt. Vergleichbare Ergebnisse hat dieselbe Arbeitsgruppe mit dem sogenannten Postconditioning-Manöver erzielen können, in dem die Reperfusion in den ersten Minuten durch kurze repetitive Ischämiephasen unterbrochen wird. Dieses Postconditioning-Manöver führte zur Reduktion der Infarktgröße (Staat et al. 2005, Thibault et al. 2008).

Als morphologisches Korrelat für den Reperfusionsschaden findet man im reperfundierten Myokard eine Zone von hyperkontrahierten Myofibrillen und Rupturen an der Plasmamembran der Herzmuskelzellen (Ganote 1983, Garcia-Dorado et al. 2004). In ischämisch-reperfundierten Herzen wird dieses histologische Bild als „Kontraktionsbandnekrose“ bezeichnet (Barrabes et al. 1996, Ganote 1983). Hierfür ist eine exzessive Kontrakur der Herzmuskelzellen verantwortlich. Diese Tatsache wurde sowohl in vitro als auch in vivo durch Arbeiten des eigenen Institutes und anderer Arbeitsgruppen festgestellt, unter anderem durch Experimente, in denen durch eine kurzzeitige pharmakologische Blockade des kontraktilen Apparates mit dem 2,3-butanedione monoxime (BDM), einem spezifischen Hemmer der Aktin-Myosin-Verbindung, die Kontraktur von Kardiomyozyten im reperfundierten Gewebe verhindert und nachfolgend die Pumpfunktion verbessert werden konnte (Moriguchi A et al. 2010, Garcia-Dorado et al. 1992, Siegmund et al. 1991).

1.2 Pathophysiologische Vorgänge während der Ischämie

Im Verlauf der Ischämie fällt aufgrund des Sauerstoffmangels die mitochondriale Atmung aus. Der Energiebedarf wird zunächst anaerob durch die Glykolyse statt durch Phosphorylierung von ATP gedeckt. Die Nettohydrolyse von ATP und die Bildung von Milchsäure führen zur Ansäuerung des ischämischen Myokards (Schäfer et al., 2001; Owens et al. 1996; Dennis et al. 1991).

Die durch die anaerobe Atmung entstehende ischämische Ansäuerung aktiviert verschiedene transmembranäre Mechanismen zum Transport von H^+ und HCO_3^- . Hierzu gehört in Kardiomyozyten auch der Na^+/H^+ -Austauscher (Frelin et al. 1985), der Protonen (H^+) im Austausch gegen Na^+ aus dem Zytosol entfernt. Es resultiert eine intrazelluläre Akkumulation von Na^+ . Ein Teil der Protonen verbleibt, bedingt durch den Abbau der transsarkolemmalen Gradienten, im Zytosol und bewirkt dort eine zunehmende Ansäuerung (Hendrikx et al. 1994). Hierdurch wird die Phosphofruktokinase, das Schlüsselenzym der Glykolyse, inhibiert und die glykolytische Bildung von ATP vermindert (Fidelman et al. 1982).

Die Verminderung des zytosolischen ATP-Gehalts führt zur funktionellen Einschränkung aller primär bzw. sekundär aktiven Transportmechanismen, so dass schließlich auch die anaerobe ATP-Produktion gehemmt wird. Das Energiedefizit

führt zur Verlangsamung bzw. zum Stillstand wichtiger metabolischer Funktionen. Die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase wird eingeschränkt und das über die sarkolemmalen Mechanismen (Na^+/H^+ -Austauscher, Na^+ -Kanäle) einströmende Na^+ kann nicht mehr entfernt werden. Na^+ akkumuliert im Zytosol und führt über Aktivierung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers im „reverse mode“ zu einer Ca^{2+} -Überladung des Zytosols (Schäfer et al. 2001, Inserte et al. 2002). Die wichtigen Mechanismen der Ca^{2+} -Überladung in der Ischämie sind schematisch in Abbildung 1 zusammengefasst. Die zytosolische Ca^{2+} -Überladung während der Ischämie ist pathophysiologisch von großer Bedeutung, da dadurch strukturschädigende Mechanismen während der Reperfusion aktiviert werden, die eine dauerhafte Funktionseinschränkung zur Folge haben (Piper et al. 2004, 2008; Garcia-Dorado et al. 2004). Zu diesen strukturschädigenden Mechanismen zählt die Veränderung des Phosphorylierungszustands von Strukturproteinen, die zur Störung der zytoskelettalen Stabilität und der Aktivierung lytischer Enzyme führt (Farber et al. 1981). Die Herzmuskelzellen sind besonders davon betroffen, da die hohe zytosolische Ca^{2+} -Konzentrationen zur übermäßigen Aktivierung des kontraktilen Apparates und somit zur Hyperkontraktur führen (Piper 1989, Sigmund et al. 1993).

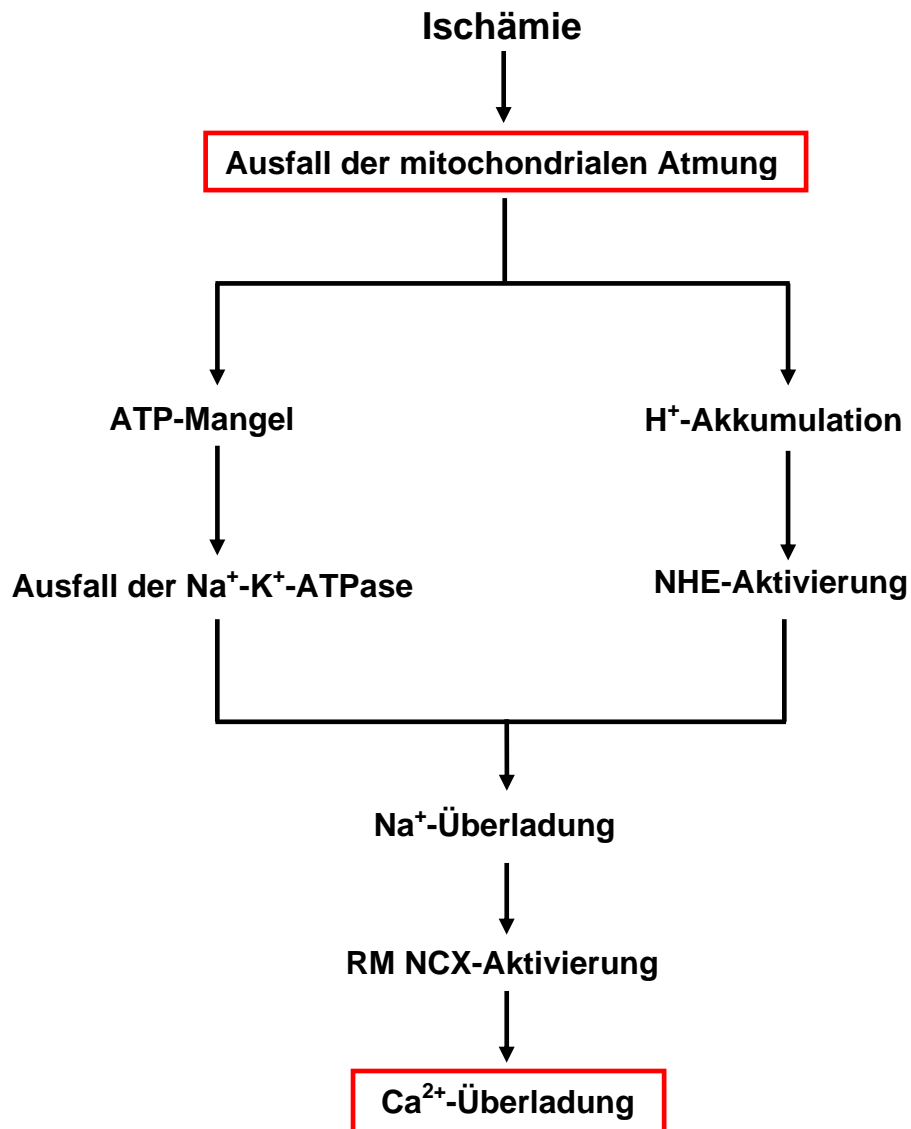


Abbildung 1: Mechanismen der zytosolischen Ca^{2+} -Überladung in Kardiomyozyten während Ischämie. RM NCX, Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher im „reverse mode“; NHE, Na^+ - H^+ -Austauscher.

1.3 Mechanismen des Reperfusionsschadens

Die einsetzende Reperfusion, also die Wiederversorgung mit Sauerstoff und Substraten, führt zur Reenergetisierung des zuvor ischämischen Myokards. Die Reenergetisierung der Zellen bei erhöhtem zytosolischen Ca^{2+} führt zu einer anhaltenden und überschießenden Aktivierung der Myofibrillen und einer konsekutiven Zellverkürzung (Siegmund et al. 1991, 1997). Dieser Vorgang wird als Hyperkontraktur bezeichnet und verläuft in der Regel irreversibel. Eine besondere Rolle spielt dabei das sarkoplasmatische Retikulum (SR), da es in Anwesenheit von ATP Ca^{2+} aus dem Zytosol durch die SERCA aufnimmt und dies wieder unmittelbar über den Ryanodin-sensitiven Ca^{2+} -Kanal freisetzt. Die Wiederholung dieses Vorganges führt zum Auftreten von hochfrequenten Ca^{2+} -Oszillationen und sehr hohen Ca^{2+} -Spitzenkonzentrationen im Zytosol, die eine exzessive Aktivierung der Myofibrillen und somit eine Hyperkontraktur der Kardiomyozyten zur Folge haben. Die Mechanismen der Hyperkontrakturentwicklung in der Reperfusion sind in Abbildung 2 schematisch zusammengefasst.

Die Entwicklung der Hyperkontraktur ist charakteristisch für den Reperfusionsschaden. Im Gewebe führt die Hyperkontraktur einander benachbarter Zellen zu Rupturen von Zellmembranen und damit unmittelbar zur Nekrose (Ruiz-Meana et al. 2009, Barrabes et al. 1996, Ganote 1983).

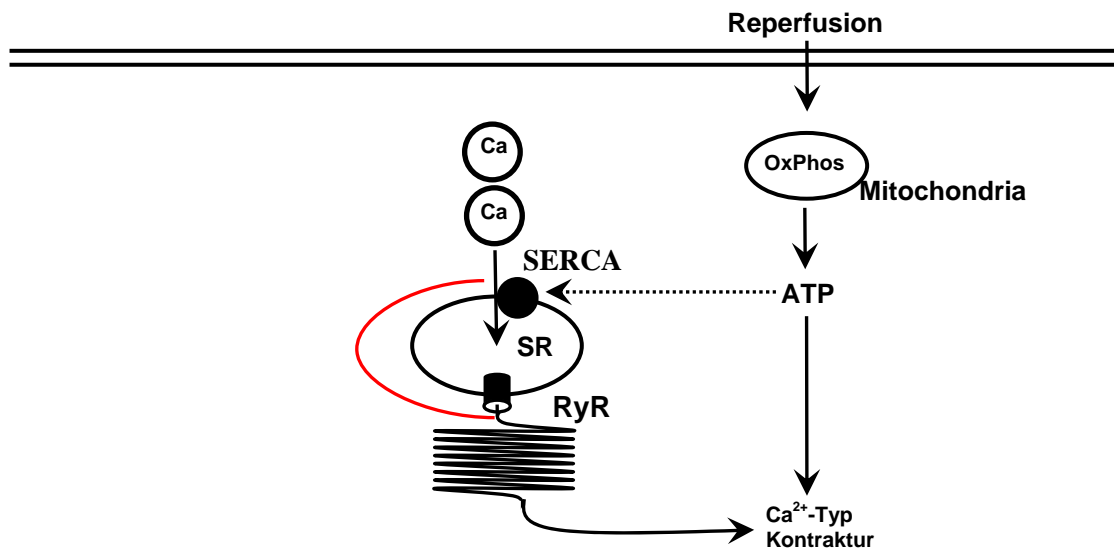


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Mechanismen der Hyperkontrakturentwicklung in der Reperfusion. SR, sarkoplasmatisches Retikulum; SERCA, Ca^{2+} -Pumpe des sarkoplasmatischen Retikulums; RyR, Ca^{2+} -Freisetzungskanal des SR (Ryanodine); OxPhos, oxidative Phosphorylierung.

1.4 Die Rolle der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore

Zahlreiche Studien in vivo und in vitro haben gezeigt, dass die mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Poren (MPTP) bei der Entstehung des Ischämie-Reperfusionsschadens von besonderer Bedeutung sind (Housenloy et al. 2003, Halestrap et al. 2004, Arguad et al. 2005, Gateau-Roesch et al. 2006). Die Gabe des spezifischen MPTP-Inhibitors Cyclosporin A während der Reperfusion führte zur Reduktion der Infarktgröße bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt (Piot et al. 2008). Bei der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore handelt es sich um einen mitochondrialen Proteinkomplex, der unter bestimmten Situationen von zellulärem Stress, z.B. bei zytosolischer Ca^{2+} -Überladung oder erhöhten Konzentrationen an reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS), sogenannte Mega-Poren zwischen der inneren und äußeren mitochondrialen Membran bildet. Diese Mega-

Poren sind für Moleküle bis 1,5 kDa permeabel (Halestrap et al. 2002, 2004, 2007). Die Öffnung der MPTP führt daher zum Verlust der mitochondrialen Ionenkompartimentierung sowie zum Zusammenbruch der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung und kann sowohl nekrotischen als auch apoptotischen Zelltod verursachen (Halestrap et al. 2004).

Die genaue Struktur der MPTP ist noch nicht geklärt. Nach bisherigen Erkenntnissen sind drei wichtige Komponenten an ihrem Aufbau beteiligt, einem zur äußeren mitochondrialen Membran gerichteten spannungsgesteuerten Anionenkanal (VDAC), Cyclophilin D (CyP-D) und einer zur inneren mitochondrialen Membran gerichteten Adenin-Nukleotid-Translokase (ANT) (Halestrap et al. 2002). Baines und Mitarbeiter haben gezeigt, dass Cyclophilin D eine unverzichtbare Komponente für die MPTP-Öffnung darstellt. Das Fehlen dieses Proteins reduziert im ischämisch-reperfundierten Myokard den nekrotischen, nicht aber den apoptotischen Zelltod (Baines et al. 2005; Nakagawa et al. 2005, Leung et al 2008).

Es wurde schon gezeigt, dass die Mitochondrien und das sarkoplasmatische Retikulum in den Kardiomyozyten eng benachbart sind und dass die Mitochondrien in der Lage sind Ca^{2+} aktiv aufzunehmen, wenn die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum erfolgt (Duchen et al. 1998, Szalai et al. 2000). Unter physiologischen Bedingungen stimuliert der mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme die oxidative Phosphorylierung und die damit verbundene Produktion von ATP (Maack et al. 2006, Maack und O'Rourke 2007). Die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase wird somit auch durch die Mitochondrien reguliert, wobei das Calcium über den mitochondrialen Ca^{2+} -Transporter (MCU: mitochondrialer Calcium-Uniporter) ins Mitochondrium aufgenommen werden kann (Maack et al. 2006; Halestrap et al. 2004). Über den Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher kann das Ca^{2+} wieder aus den Mitochondrien ausgeschleust werden (Maack et al. 2006). Bei starker Erhöhung der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration kommt es jedoch durch Bindung von Ca^{2+} an Cyclophilin D zu einer irreversiblen MPTP-Öffnung.

1.5 Hypothese

In dieser Studie haben wir die Hypothese aufgestellt, dass innerhalb einer Herzmuskelzelle die reperfusionsinduzierten Ca^{2+} -Oszillationen zwischen dem Zytosol und dem sarkoplasmatischen Retikulum zu einer Ca^{2+} -Überladung in den benachbarten Mitochondrien führten.

Die mitochondriale Ca^{2+} -Überladung führt durch Bindung von Calcium an Cyclophilin D zur MPTP-Öffnung. Die MPTP-Öffnung führt zum Ausströmen des mitochondrialen Ca^{2+} ins Zytosol. Die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration steigt erneut und verstärkt so die primär SR-abhängigen Ca^{2+} -Oszillationen in den reperfundierten Herzmuskelzellen.

1.6 Ziele der Arbeit

Folgende Fragen wurden am Modell isolierter Kardiomyozyten bei Bedingungen simulierter Ischämie und Reperfusion untersucht:

- 1) ob und wann eine MPTP-Öffnung stattfindet,
- 2) welche Rolle die SR-abhängigen Ca^{2+} -Oszillationen und die MPTP-Öffnung bei der Entwicklung der Hyperkontraktur in der Reperfusion spielen, und
- 3) ob der Verlust der mitochondrialen Ca^{2+} -Sequestrierung bei der MPTP-Öffnung die SR-abhängigen Ca^{2+} -Oszillationen verstärkt.

1.7 Modell der simulierten Ischämie und Reperfusion an isolierten Kardiomyozyten

In der vorliegenden Arbeit wurden am Einzelzellmodell erwachsener ventrikulärer Rattenkardiomyozyten die In-vivo-Situation von Ischämie und Reperfusion simuliert und die Ursache für den entstehenden Reperfusionsschaden analysiert. Für die Analyse von Ionenhomöostase und Zellschädigung ist der Gebrauch dieses Modells von Vorteil, da es erlaubt, Veränderungen im Stoffwechsel und der zytosolischen Ionenkonzentration in der frühen Reoxygenationsphase direkt auf zellulärer Ebene zu analysieren und mit der Entwicklung der reoxygenationsinduzierten Hyperkontraktur in kausalen Zusammenhang zu setzen. Hierfür wird die Video-Imaging-Mikroskopie nach Inkubation der Zellen mit geeigneten zellpermeablen Fluorochromen genutzt. Das Elementargeschehen in der Reperfusion kann in diesem Modell auch deshalb besonders gut untersucht werden, da die Kardiomyozyten während der Hyperkontraktur keinen Zugkräften von benachbarten Zellen ausgesetzt sind und somit ihre sarkolemmale Integrität erhalten bleibt.

2. Material

2.1. Chemikalien

Albumin (aus Rinderserum)	Roche Applied Science, Mannheim
JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'- Tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide)	Molecular Probes, Holland
Kollagenase, Typ CLS II (322U/mg)	Biochrom KG, Berlin
Cystein	Sigma, Taufkirchen
Fura-2 AM	Molecular Probes, Leiden, NL
Calcein AM	Molecular Probes, Leiden, NL
HEPES	Roche Applied Science, Mannheim
Medium 199	Biochrom, Berlin
N ₂	Messer Griesheim, Krefeld
Ru 360	Calbiochem, Darmstadt
CSA	Calbiochem, Darmstadt
Ryanodin	Calbiochem, Darmstadt

Die übrigen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Calbiochem, Sigma, Roche Applied Science, Invitrogen (Eggenstein) und VWR (Darmstadt) in der höchsten erhältlichen Qualität bezogen.

Alle verwendeten Chemikalien wurden nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt.

2.2. Häufig verwendete Medien und Puffer

2.2.1. Zellkulturmedien

Medium 199-Stammlösung:

Medium 199 EARLE'S salt	9,8 g
Aqua dest.	1,0 l

CCT/HEPES-Stammlösung:

• HEPES	36 g/l
• Kreatin	5,0 mM
• Karnitin	2,0 mM
• Taurin	5,0 mM

Diese Lösung wurde bei 37°C mit 1 M NaOH auf pH 7,4 titriert.

Zusammensetzung des **Vorplattierungsmediums**:

• CCT/HEPES-Stammlösung	4% (vol/vol)
• FCS	4% (vol/vol)
• Penicillin	100 IU/ml
• Streptomycin	10 µg/ml

Zusammensetzung des **Ausplattierungsmediums**:

• CCT/HEPES-Stammlösung	4% (vol/vol)
• Penicillin	100 IU/ml
• Streptomycin	10 µg/ml

Alle Medien wurden sterilisiert und bei 4°C aufbewahrt.

2.2.2. Perfusionsmedien

Die in unseren Experimenten verwendeten Perfusionsmedien werden im Folgenden beschrieben.

Normoxische HEPES-gepufferte Tyrode-Lösung (Normoxiemedium):

Substanz	Konzentration in mM
NaCl	125,0
KCl	2,6
KH ₂ PO ₄	1,2
MgSO ₄	1,2
CaCl ₂	1,0
HEPES	25,0
Glukose	2,5

Die Lösung wurde bei 37°C mit 1 M NaOH auf pH 7,4 titriert.

Anoxische HEPES-gepufferte Tyrode-Lösung (Anoxiemedium):

Substanz	Konzentration in mM
NaCl	125,0
KCl	2,6
KH ₂ PO ₄	1,2
MgSO ₄	1,2
CaCl ₂	1,0
HEPES	25,0

Die Lösung wurde bei 37°C mit 1 M NaOH auf pH 6,4 titriert.

Das Anoxiemedium wurde nach der von Allshire et al. (1987) beschriebenen Methode in dampfdrucktauglichen Gefäßen für 40 min bei 2 bar und 120°C autoklaviert.

2.3. Geräte und Laborbedarf

2.3.1. Zellkultur und Herzmuskelzellisolierung:

Brutschrank	Kendro, Hanau
Deckgläser	Menzel, Braunschweig
Gewebehacker	Harvard Apparatus über Hugos Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Langendorff-Apparatur	Eigenbau, Physiologisches Institut, Gießen
Mikroskop	Olympus, Hamburg
Nylonnetz	NeoLab, Heidelberg
Präparationsbesteck	Eickenmeyer, Tuttlingen
Sterilbank	Kendro, Hanau

2.3.2. Fluoreszenzmessungen:

Inverses Mikroskop	Olympus, Hamburg
Xenonlampe	USHIO INC., Japan
Monochromator	TILL Photonics, Gräfelfing
Dichroid-Spiegel	TILL Photonics, Gräfelfing
Emissionsfilter	TILL Photonics, Gräfelfing
CCD Camera	TILL Photonics, Gräfelfing
Computer-Software	TILL Photonics, Gräfelfing

2.3.3. Anoxie-Reoxygenationsexperimente:

Dampfdruckkochtopf	All American, Canada
Druckstabile Glasgefäße mit verschließbarem Deckel	Bormioli Rocco, Italien
Edelstahlkapillaren	Alltech, Unterhaching
Gasdichte Schläuche	Kahlensee, Gießen
Gasventile	Kahlensee, Gießen
Peristaltikpumpe	Gilson-Abimed, Langenfeld
Perfusionskammer	Eigenbau, Physiologisches Institut, Gießen

2.3.4. Weitere Geräte:

Glasgeräte	Schott, Mainz
Heizrührer	Jahnke& Kunkel, Staufeu
Inkubator	Kendro, Hanau
Perfusionsheizung	Eigenbau, Physiologisches Institut, Gießen
pH-Meter	HANNA Instruments, Kehl am Rhein
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifugen	Haraeus, Hanau

2.3.5. Verbrauchsmaterialien:

Kulturschalen, Typ Falcon 3001	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen	Eppendorf-Nethler-Hinz, Hamburg

3. Methoden

3.1. Herzmuskelzellisolierung

3.1.1. Versuchstiere

In unserem Modell wurden Herzmuskelzellen erwachsener 200-300 g schwere Wistar-Ratten verwendet, die im Tierstall des Physiologischen Institutes gezüchtet wurden und freien Zugang zu Nahrung (ALTROMIN) und Wasser hatten.

3.1.2. Herzmuskelzellpräparation

Die Isolierung der Herzmuskelzellen fand nach der von Piper et al. (1982) beschriebener Methode statt.

Als Lösungen wurden verwendet:

Ca²⁺-Stammlösung:

Substanz	Konzentration in mM
CaCl ₂	100,0

Powell-Medium:

Substanz	Konzentration in mM
NaCl	110,0
NaHCO ₃	25,0
KCl	2,6
KH ₂ PO ₄	1,2
MgSO ₄	1,2
Glukose	11,0

Kollagenasepuffer:

Substanz	Menge
Powell-Medium	50 ml
Kollagenase	20 mg
Ca ²⁺ - Stammlösung	12,5 µl

Nach kurzer Äthernarkose wurden die Tiere durch Genickbruch getötet. Nach Öffnen des Brustraumes wurde das Perikard entfernt, Herz und Lunge angehoben, durch Scherenschlag vom Körper getrennt und sofort in eiskalte isotonische NaCl-Lösung gelegt. Hier wurden Gewebereste vom Herz abpräpariert und dieses danach mit der Aorta ascendens an eine Langendorff-Apparatur angeschlossen. Hier wurde es zunächst für kurze Zeit mit Powell-Medium retrograd perfundiert, um das in den Koronarien verbliebene Blut auszuwaschen. Anschließend wurde es bei einer Flussrate von 2-3 ml/min rezirkulierend mit Kollagenasepuffer perfundiert. Dann wurden die Ventrikel von den Vorhöfen abgeschnitten und das Ventrikelgewebe erst mechanisch mit einem Gewebehacker, anschließend mit zwei Skalpellen manuell zerkleinert. Danach schloss sich eine zehnminütige Inkubation des Gewebes in Rezirkulationspuffer an (37°C). Die Mazeration der Kardiomyozyten wurde durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit einer 5 ml Pipette unterstützt. Um restliche Zellaggregate zu entfernen, wurde die Suspension durch ein Nylonnetz (0,2 mm Porengröße) gefiltert. Jetzt wurde die Zellsuspension bei 25×g für 3 min zentrifugiert. Das Pellet wurde nach Aufnahme in Powell-Medium (mit 200 µM CaCl₂) ein zweites Mal bei 25×g für 2 min zentrifugiert. Dann wurde das Pellet in Powell-Medium, das 400 µM CaCl₂ enthielt, aufgenommen und durch Aufschütteln resuspendiert. Diese Suspension wurde entsprechend der Anzahl der präparierten Herzen auf Reagenzgläser verteilt, die zuvor mit einer ca. 10 ml hohen Flüssigkeitssäule aus Powell-Medium beschickt worden waren. Nach erneuter Zentrifugation (25×g für 1 min) erhielt man eine Zellpopulation, die zu 70-80% aus stäbchenförmigen, lebenden Kardiomyozyten bestand.

3.2. Zellkultur

Die Kulturschalen wurden, um ein Anheften der Kardiomyozyten an den Glasdeckgläschen zu erreichen, über Nacht mit dem Vorplattierungsmedium (s. Kap.2.2.1) beschickt, das dann unmittelbar vor dem Ausplattieren abgesaugt wurde. Im Ausplattierungsschritt wurde das zuletzt gewonnene Pellet vorsichtig in Ausplattierungsmedium aufgenommen (25 ml pro Herz) und auf die vorplattierten Schalen verteilt. Nach einer vierstündigen Anheftungsphase (37°C) wurde das Ausplattierungsmedium gewechselt, wobei abgerundete, tote Zellen entfernt wurden, sodass die letztendliche Kultur aus ca. 90% stäbchenförmigen Kardiomyozyten bestand. Diese auf den Glasdeckgläschen anhaftenden Kardiomyozyten konnten dann unmittelbar für unsere Anoxie-Reoxygenationsexperimente genutzt werden oder nach anoxischer Inkubation gelelektrophoretischen Methoden zugeführt werden.

3.3. Anoxie-Reoxygenations-Experimente

3.3.1. Versuchsaufbau

Für unsere Anoxie-Reoxygenationsexperimente wurden die Glasdeckgläschen mit den darauf haftenden Kardiomyozyten in eine Perfusionskammer eingebaut und diese danach gasdicht verschlossen. Die Medien wurden mittels einer Peristaltikpumpe durch Edelstahlkapillaren mit einem Reservoir verbunden und mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min durch die Perfusionskammer gepumpt. Das anoxische Medium wurde während des Versuches mit 100% N₂ begast und dann wurde das ganze System gasdicht abgeschlossen. Die Temperatur in der Perfusionskammer betrug 37°C.

3.3.2. Fluoreszenzmikroskopische Messungen zur Ermittlung der intrazellulären Kationenhomöostase

Die Ionenmessungen wurden auf der Basis der Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Aus dem von einer Xenonlampe generierten Licht wird die passende Wellenlänge ausgewählt und auf die mit Fluoreszenzfarbstoff beladenen Zellen in die Perfusionskammer gelenkt. Das von den Zellen ausgehende Fluoreszenzlicht gelangte durch einen Dichroidspiegel und einen Emissionsfilter zu einer Kamera, die an ein Computersystem angeschlossen war. Die Daten der fluoreszenzmikroskopischen Messungen wurden mit Hilfe des TILL Photonics-Systems ausgewertet.

3.3.3. Ermittlung der zytosolischen und mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration mittels des Fluoreszenzindikators Fura-2 AM

Um die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration zu bestimmen, wurden die Zellen für 30 min bei 37°C mit Fura-2 AM (2,5 μM) in Medium 199 beladen. Fura-2 AM gelangt als Acetoxymethylester in die Zellen, wird dort von intrazellulären Esterasen gespalten und kann als geladenes Molekül nicht mehr die Membran permeieren. Es erfolgte dann eine 15-minütige Nachinkubation im CCT/HEPES-Stammlösung. Die Anregung von Fura-2 AM erfolgte mit den Wellenlängen 340 nm und 380 nm, das Emissionsmaximum lag bei ~ 510 nm. Die Daten der Fura-2-Messung werden als Ratio (340 nm/380 nm) wiedergegeben.

Um die mitochondriale Ca^{2+} -Konzentration zu bestimmen, wurden die mit Fura-2 beladenen Zellen nach der 30minütigen Inkubation mit Manganchlorid (1.5 μM) für 15 Minuten nachinkubiert. Da Mangan die mitochondriale Membran nicht durchdringen kann, aber die zytosolische Fura-2-Fluoreszenz zu löschen vermag, führte diese Prozedur zur nahezu ausschließlichen mitochondrialen Kompartimentierung von Fura-2. Die Anregung von Fura-2 AM erfolgte wie für das zytosolische Ca^{2+} mit den Wellenlängen 340 nm und 380 nm, das Emissionsmaximum lag bei ~ 510 nm.

3.3.4. Detektion der MPTP-Öffnung

Da die MPTP-Öffnung zum Verlust der mitochondrialen Integrität und als Folge zum Ausströmen von Molekülen bis 1,5 kD führt, verwendeten wir den Fluoreszenzindikator Calcein AM (1-1,2 kD), um die MPTP-Öffnung fluoreszenzmikroskopisch in lebenden Zellen detektieren zu können. Um die Zellen mit Calcein zu beladen, wurden diese für 30 min bei 37°C mit Calcein (2,5 µM) inkubiert. Calcein gelangt in die Zellen und lagert sich vorzugsweise in den Mitochondrien an. Um das zytosolische Kompartiment des Calceins zu eliminieren, wurden die Zellen unmittelbar vor und während des Versuches mit CoCl₂ (200 µM) inkubiert. Cobalt löscht die zytosolische Calcein-Fluoreszenz, dringt aber nicht in die Mitochondrien ein. Daher bleibt nach dieser Prozedur nur eine mitochondriale calcein-fluoreszenz. Der Fluoreszenzfarbstoff Calcein wird mit den Wellenlängen 480 nm angeregt, wobei das Emissionsmaximum bei 530 nm liegt.

3.3.5. Messung des mitochondrialen Membranpotentials mit JC-1:

JC-1 ist ein kationischer, membranpermeabler Fluoreszenzfarbstoff, der Mitochondrien lebender Zellen mit intaktem Membranpotential (membranpotentialabhängig) anfärbt.

Er existiert in zwei verschiedenen Zustandsformen: als Monomer und als Aggregat. Die Monomere aggregieren bei höheren Farbstoffkonzentrationen, oder höherem mitochondrialem Membranpotential zu so genannten J-Aggregaten, die rot fluoreszieren. Das verursacht eine Veränderung in den Absorptions- und Fluoreszenzspektren. Die Monomere treten bevorzugt bei niedrigem Membranpotential oder niedriger Farbstoffkonzentration auf und fluoreszieren grün. Beide Formen können simultan gemessen werden.

Entsprechend der Änderungen im Membranpotential, kann unter dem Fluoreszenzmikroskop eine Farbveränderung zwischen rot und grün beobachtet werden. JC-1-Monomere zeigen hierbei die grünliche Fluoreszenz (Lambda em= 527 nm), während die J-Aggregate rötlich fluoreszieren (Lambda em=590 nm).

3.3.6. Experimentelles Protokoll

Zur Simulation von Ischämie und Reperfusion wurden die Kardiomyozyten für 40-70 min mit Anoxiemedium und anschließend für 15 min mit Reoxygenationsmedium perfundiert. (s. Kap. 3.3). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aktivatoren oder Inhibitoren eingewaschen, die in der folgenden Tabelle beschrieben werden. Auch bei der anoxischen Inkubation oder in der Reoxygenation von Kardiomyozyten, die danach der Gelelektrophorese zugeführt wurden, wurden zu bestimmten Zeitpunkten diese Substanzen hinzugegeben.

Substanz	Konzentration	Eigenschaften
Cyclosporin A	1 μM	Spezifischer MPTP-Hemmer
Ryanodin	5 μM	Hemmer der SR- Ca^{2+} -Freisetzung
Ru 360	10 μM	MCU-Inhibitor (mitochondrialer Ca^{2+} -uniporter)

3.3.7. Messparameter

Die folgenden Parameter wurden in den Experimenten bestimmt.

Parameter	Einheit	Methode
Zytosolischer Ca^{2+} -Gehalt	"relative Einheiten" (r.E.) des Fura-2-Ratios oder als Absolutwerte	Fura-2
Ca^{2+} -Oszillationen	Anzahl der Oszillationen/min	Fura-2
Zelllänge	Zelllänge in % bezogen auf die Ausgangslänge	Zelllängenmessung
MPTP-Öffnung	Mitochondriale Calcein-Fluoreszenz in % bezogen auf den Anfangswert	Calcein AM
MPTP-Öffnung	JC-1-Fluoreszenz in % bezogen auf den Anfangswert	Bestimmung der zeitlichen Änderung des Membranpotentials ($\Delta\Psi$)

Mitochondriales Calcium	Mitochondriale Calcein-Fluoreszenz in % bezogen auf den Anfangswert	Calcein AM
-------------------------	---	------------

3.4. Statistik

Die Daten wurden als Mittelwerte \pm SEM von verschiedenen Experimenten wiedergegeben.

Statistische Vergleiche wurden durch einfache Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) unter Nutzung des Student-Newman-Keuls-Tests für post-hoc Analysen durchgeführt. Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1. MPTP-Öffnung während simulierter Ischämie und Reperfusion

Im ersten Teil dieser Studie wurde der Status der MPTP während simulierter Ischämie und Reperfusion untersucht. Die MPTP-Öffnung wurde mit zwei Methoden analysiert, nämlich durch die Analyse des mitochondrialen Calcein-Verlusts und des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi$).

Detektion der MPTP-Öffnung durch Bestimmung des mitochondrialen Calceinverlusts

Nachdem die Zellen mit Calcein und CoCl_2 inkubiert wurden, wurden diese einer 80-minütigen simulierten Ischämie und anschließend einer 20-minütigen Reperfusion ausgesetzt. CoCl_2 wurde in den Inkubationsmedien zugefügt, um die zytosolische Calceinfluoreszenz zu löschen. Während die Calcein-Fluoreszenz in der Ischämie unverändert blieb, kam es in den ersten 5-10 Minuten der Reperfusion zu einem starken Verlust des mitochondrialen Calceins, der sich als starke Abnahme der mitochondrialen Calcein-Fluoreszenz darstellen lässt (Abb. 1A).

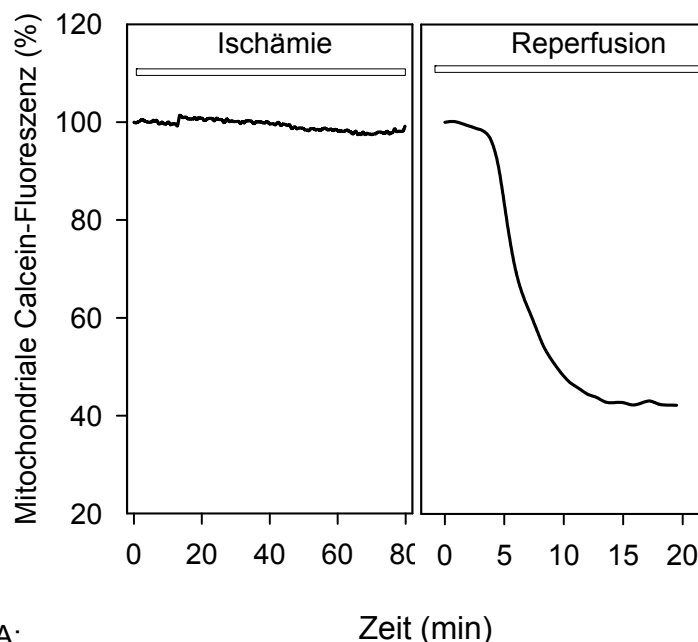


Abbildung 1A:

Exemplarischer Verlauf der mitochondrialen Calcein-Fluoreszenz während der Ischämie und Reperfusion von einem isolierten Kardiomyozyten. Die Werte am Anfang der Ischämie wurden auf 100% gesetzt.

Detektion der MPTP-Öffnung durch Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials

Unter physiologischen Bedingungen haben die Mitochondrien ein negatives Membranpotential bis -180 mV , das durch die Ausschleusung von Protonen (H^+) aus den Mitochondrien entsteht. Da die MPTP-Öffnung zum Verlust des Protonengradient führt, kommt es zum Kollaps des mitochondrialen Membranpotentials. Die zeitliche Änderung des Membranpotentials ($\Delta\Psi$) haben wir mit Hilfe von dem Fluorochrom JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-Tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine Iodide) während der Ischämie und der Reperfusion analysiert. Wie auf der Abbildung 2A veranschaulicht ist, führt die simulierte Ischämie zur reversiblen Abnahme der JC-1 Fluoreszenz-Ratio, was die Depolarisation der Mitochondrien widerspiegelt. Während der ersten Minuten der Reperfusion zeigt das Membranpotential ($\Delta\Psi$) eine transiente Erholung, die von irreversibler abrupter Abnahme der JC-1- Fluoreszenz (Kollaps) zwischen der 5. und 10. Minute gefolgt ist (Abb. 2A).

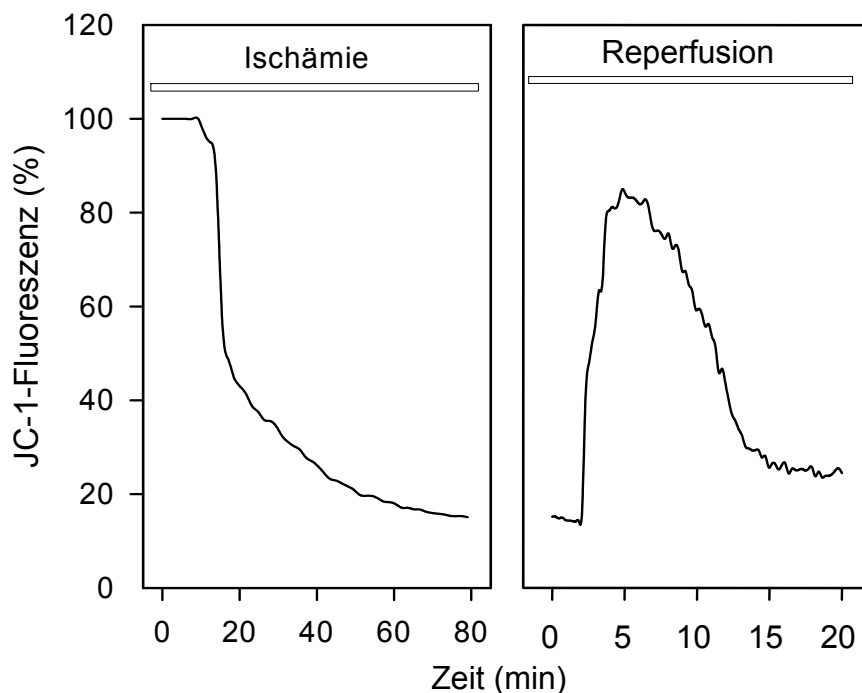


Abbildung 2A:

Exemplarische Darstellung der mitochondrialen JC-1-Fluoreszenz während simulierter Ischämie und Reperfusion in einem isolierten Kardiomyozyten. Die initiale JC-1-Fluoreszenz wurde auf 100% gesetzt.

4.2. Der Einfluss des sarkoplasmatischen Retikulums und die mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme auf die MPTP-Öffnung

Wie in den folgenden Abbildungen (2A, 2B) zu sehen ist, verhinderte die Behandlung der Kardiomyozyten mit dem spezifischen MPTP-Inhibitor Cyclosporin A ($0,5 \mu\text{M}$) während der Reperfusion signifikant den mitochondrialen Calceinverlust sowie den irreversiblen Kollaps des mitochondrialen Membranpotenzials. Diese Daten zeigen deutlich, dass der mitochondrialen Calceinverlust sowie der resultierende Kollaps des mitochondrialen Membranpotenzials als Folge der MPTP-Öffnung sind.

Als nächstes wurde untersucht, ob die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) über den Ryanodinrezeptor und die

mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme über den mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter MCU bei der MPTP-Öffnung eine Rolle spielen.

Um dies zu analysieren, wurde die SR- Ca^{2+} -Freisetzung während der Reperfusion mit Ryanodin (3 μM) und die mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme über den MCU mittels Ru 360 (10 μM) gehemmt. Die Abbildungen 1B und 2B zeigen, dass beide Inhibitoren (Ryanodin und Ru 360) den mitochondrialen Calcein-Verlust und den Kollaps des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi$) während der Reperfusion signifikant verringern.

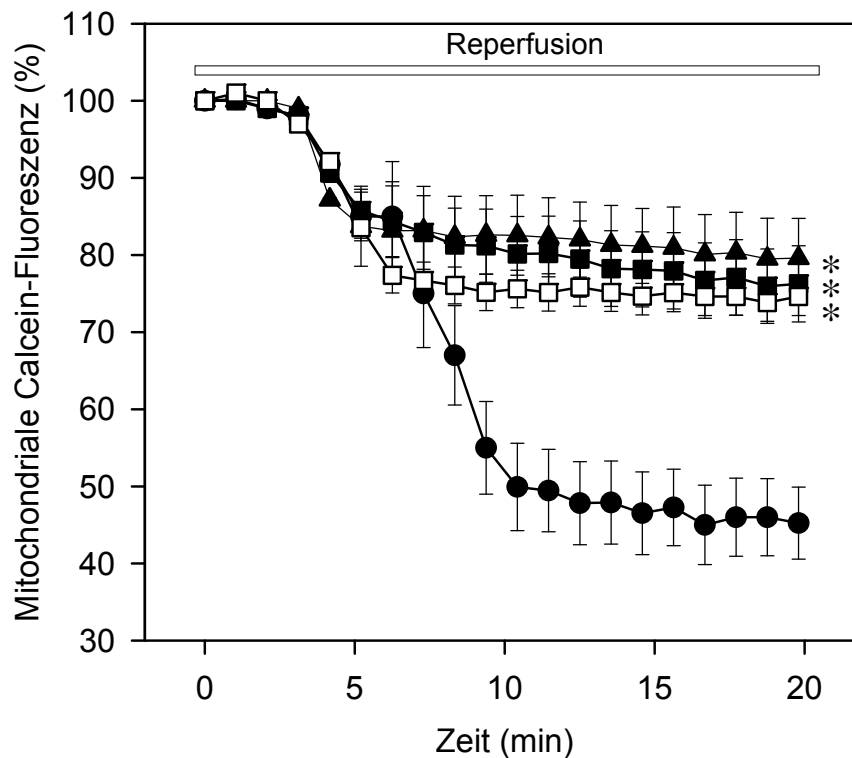


Abbildung 1B:

Zeitverlauf der mitochondrialen Calcein-Fluoreszenz während der Reperfusion nach einer 80-minütigen, simulierten Ischämie unter Kontrollbedingungen (●), und in Anwesenheit von 3 μM Ryanodin (▲), 10 μM Ru 360 (■), oder 0,5 μM Cyclosporin A (□). Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM, $n \geq 45$ Zellen von 5 unterschiedlichen Präparationen je Bedingung; * $p < 0.05$ vs. Kontrollbedingungen. Die Calcein-Fluoreszenz-Werte am Anfang der Reperfusion wurden auf 100% gesetzt.

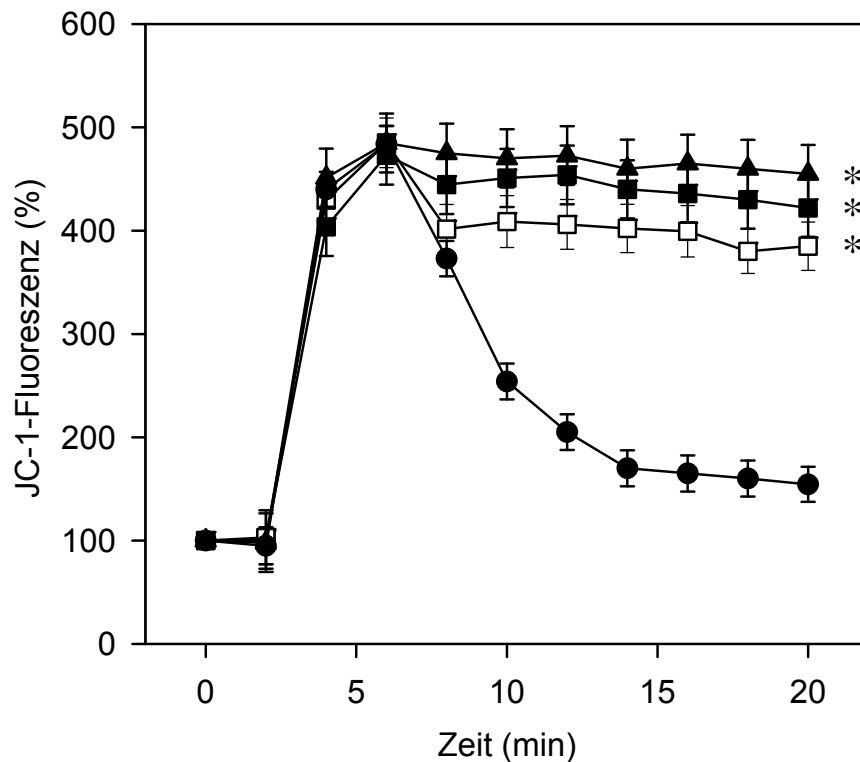


Abbildung 2B:

Zeitverlauf des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi$) während der Reperfusion nach einer 80 minütigen Ischämie unter Kontrollbedingungen (●), und in Anwesenheit von 3 μ M Ryanodin (▲), 10 μ M Ru 360 (■), oder 0,5 μ M Cyclosporin A (□). Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM, $n \geq 50$ Zellen von 5 unterschiedlichen Präparationen je Bedingung; * $p < 0.05$ vs. Kontrollbedingungen. Calcein-Fluoreszenz-Ratio-Werte wurden am Anfang der Reperfusion auf 100% gesetzt.

4.3. Die Rolle der mitochondrialen Ca^{2+} -Überladung bei der MPTP-Öffnung

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob der mitochondriale Ca^{2+} -Gehalt für die MPTP-Öffnung ursächlich ist und ob dieser vom Sarkoplasmatischen Retikulum beeinflusst werden kann. Abbildung 3A zeigt den zeitlichen Verlauf des mitochondrialen Ca^{2+} , gemessen mit einem modifizierten Fura-2-Protokoll (siehe Methoden 3.3.3), in dem das zytosolische Fura-2-Signal mit Mangan gelöscht wurde.

Unter Kontrollbedingungen steigt die mitochondriale Ca^{2+} -Konzentration in der Ischämiephase an, was als Anstieg des Fura-2-Ratios zu erkennen ist. In der Reperfusionsphase sinkt das mitochondriale Ca^{2+} vorübergehend ab, dann steigt es zwischen der 2. und der 7. Minute wieder an. Es ist hier zu berücksichtigen, dass der Anstieg der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration im gleichen Zeitfenster stattfindet, in dem auch die Ca^{2+} -Oszillationen auftreten.

Um zu untersuchen, ob die SR- Ca^{2+} -Freisetzung über den Ryanodinrezeptor beim Anstieg des mitochondrialen Calciums in den ersten Minuten der Reperfusion eine Rolle spielt, wurden Experimente in Anwesenheit von Ryanodin (Inhibitor der SR- Ca^{2+} -Freisetzung) während der Reperfusion durchgeführt. Wie die Abbildung 3A zeigt, blieb der Anstieg des mitochondrialen Calciums in Anwesenheit von Ryanodin aus. Auch die Anwesenheit des MCU-Inhibitors Ru 360 (Inhibitor der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme) zeigte einen vergleichbaren Effekt auf die mitochondriale Ca^{2+} -Kinetik. Im Gegensatz zu Ryanodin und Ru 360 stieg die mitochondriale Ca^{2+} -Konzentration in Anwesenheit von Cyclosporin A in den ersten 5-10 Minuten der Reperfusion transient an, um dann wieder zum Ausgangsniveau abzusinken.

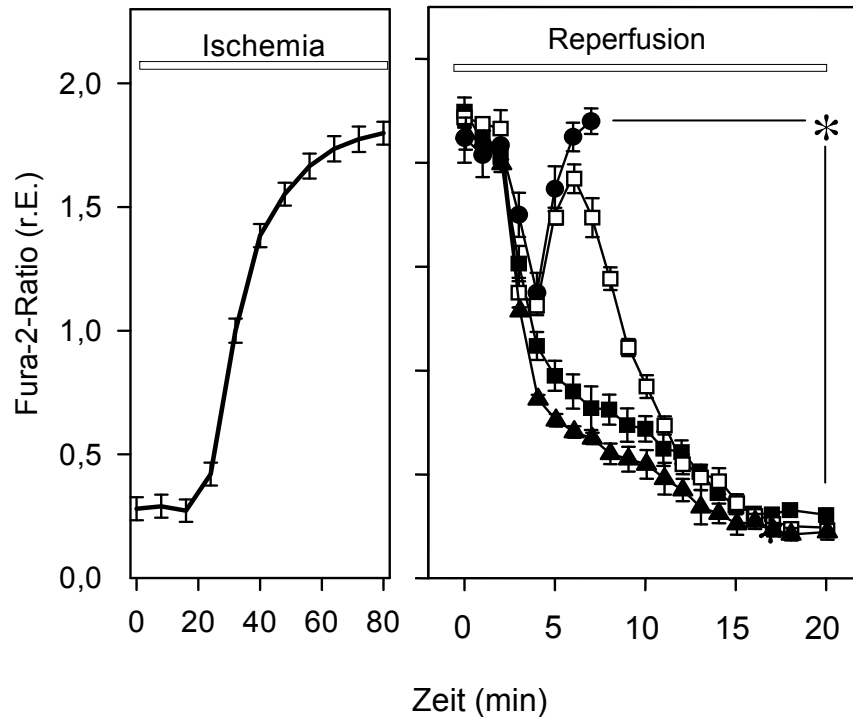


Abbildung 3A:

Zeitverlauf der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration während der Reperfusion nach einer 80 minütigen Ischämiephase unter Kontrollbedingungen (●), und in Anwesenheit von 3 μM Ryanodin (▲), 10 μM Ru 360 (■), oder 0,5 μM Cyclosporin A (□). Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM, $n \geq 55$ Zellen aus 5 unterschiedlichen Präparationen je Bedingung; * $p < 0.05$ vs. Kontrollbedingungen.

Die Analyse der isosbestischen Wellenlänge von Fura-2 (360 nm), deren Fluoreszenz unabhängig von Ca^{2+} ist und somit ein Maß für die Fura-2-Konzentration ist, zeigt einen rapiden Verlust von Fura-2 ab der 7. Minute der Reperfusion unter Kontrollbedingungen (Abb. 3B). Nach diesem Farbstoffverlust ist die Messung der Ca^{2+} -Konzentration nicht mehr möglich. Aus diesem Grund ist die mitochondriale Ca^{2+} -Konzentration in Abbildung 3A unter Kontrollbedingungen nur für die ersten 7 Minuten während der Reperfusion dargestellt. In Anwesenheit von Cyclosporin A, Ru 360 oder Ryanodin wurde kein signifikanter Verlust der Fura-2-Konzentration beobachtet. Da die zytosolische Fura-2-Fluoreszenz mit Mangan gelöscht wurde und

nur der mitochondrialen Inhalt an Fura-2 gemessen werden kann, können unsere Ergebnisse nach der Behandlung der Zellen mit Cyclosporin A, Ru 360 oder Ryanodin darauf hinweisen, dass dieser Farbstoffverlust auf eine MPTP-Öffnung zurückzuführen ist (Abbildung 3B).

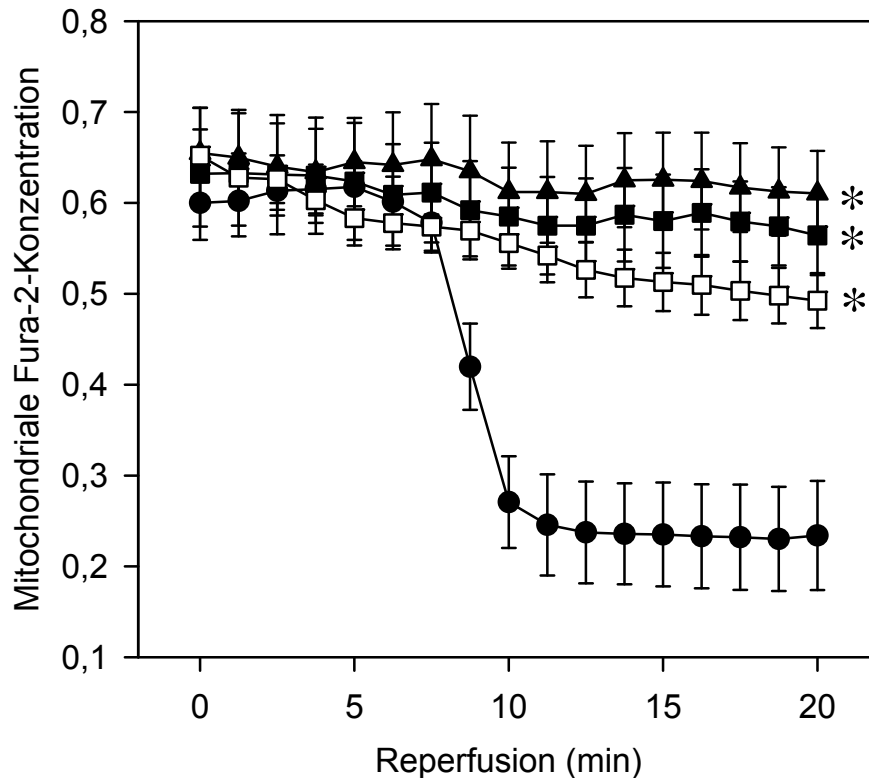


Abbildung 3B:

Zeitverlauf der mitochondrialen Fura-2-Konzentration (360 nm) während der Reperfusion nach einer 80 minütigen Ischämiephase unter Kontrollbedingungen (●), und in Anwesenheit von 3 μ M Ryanodin (▲), 10 μ M Ru 360 (■), oder 0,5 μ M Cyclosporin A (□). Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM, $n \geq 55$ Zellen aus 5 unterschiedlichen Präparationen je Bedingung; * $p < 0.05$ vs. Kontrollbedingungen.

4.4. Die zytosolische Ca^{2+} -Kinetik während der Reperfusion

Während der Ischämie steigt die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration an, es kommt zu einer zytosolischen Ca^{2+} -Überladung. In den ersten Minuten der Reperfusion kommt es zu einer transienten Ca^{2+} -Erholung, die auf eine Aktivierung der SR- Ca^{2+} -ATPase (SERCA) zurückzuführen ist. Dieser Phase folgen hochfrequente Ca^{2+} -Oszillationen, die initial durch eine wiederholte Aufnahme durch SERCA und Ca^{2+} -Freisetzung durch den Ca^{2+} -Freisetzungskanal (Ryanodinrezeptor) aus dem sarkoplasmatischen

Retikulum induziert sind. Die simultane Zelllängen-Analyse zeigt, dass die Zellen während der Ca^{2+} -Oszillationen eine Hyperkontraktur entwickeln (Abb. 4A).

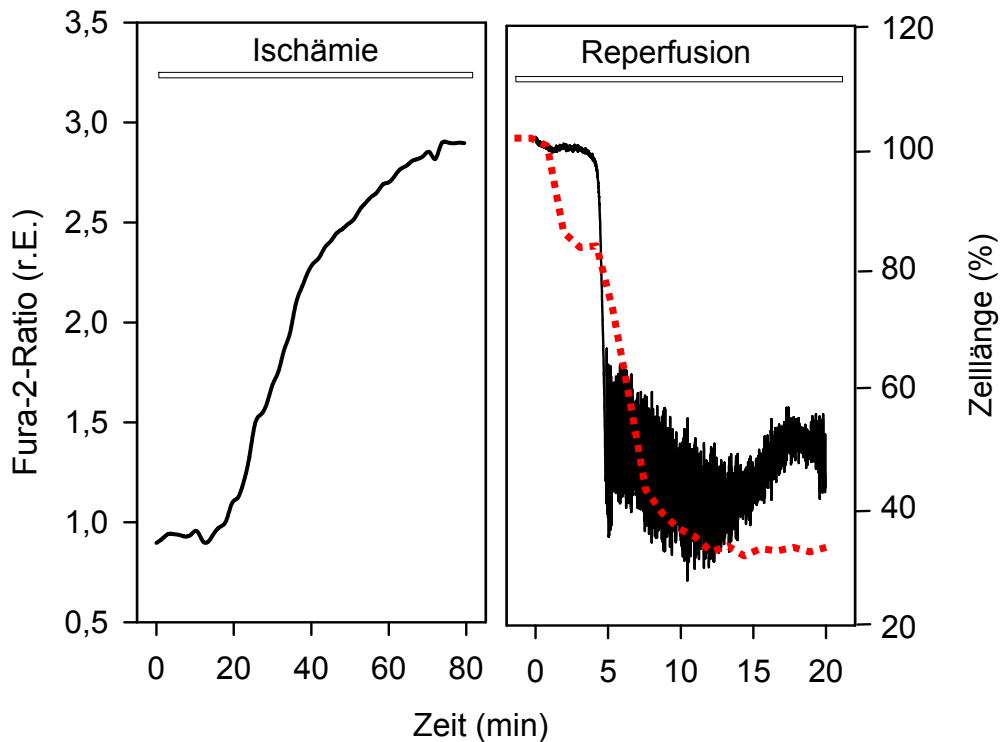


Abbildung 4A:

Exemplarischer Verlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (Fura-2-Ratio in relativen Einheiten) während der Ischämie und Reperfusion von einem isolierten Kardiomyozyten. Die gestrichelte Linie stellt die Zelllängenänderung des Kardiomyozyten (in % der Länge zu Beginn der Reperfusion) während der Reperfusion dar.

Die Anwesenheit des spezifischen MPTP-Inhibitors Cyclosporin A sowie des Inhibitors der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme Ru 360 führte zu einer signifikanten Reduktion der zytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen. Die Behandlung mit dem Inhibitor der SR- Ca^{2+} -Freisetzung Ryanodin (Inhibitor des sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Freisetzungskanals RyR) führte zu einer nahezu völligen Aufhebung der zytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen (Abbildung 4B).

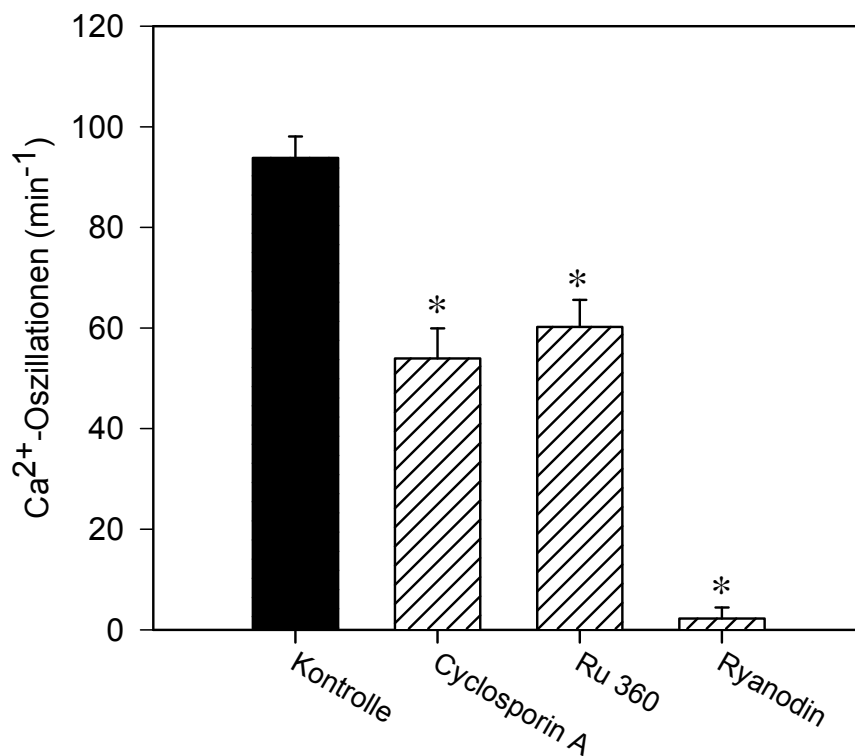


Abbildung 4B:

Mittlere Frequenz der Oszillationen vom zytosolischen Ca²⁺ (min⁻¹) zwischen der 5. und 10. Minute der Reperfusion unter Kontrollbedingungen, in Anwesenheit von 3 µM Ryanodin, 10 µM Ru 360, oder 0,5 µM Cyclosporin A. Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM, n ≥ 60 Zellen von 5 unterschiedlichen Präparationen je Bedingung; *p<0.05 vs. Kontrollbedingungen.

4.5. Zellkontraktur

Unter Kontrollbedingungen entwickeln die Kardiomyozyten während der ersten 5-10 Minuten der Reperfusion eine starke Kontraktur, die als Hyperkontraktur bezeichnet wurde. Dies findet zeitgleich mit dem Auftreten der zytosolischen Ca²⁺-Oszillationen statt. Die Hyperkontraktur beruht auf einer anhaltenden und überschießenden Aktivierung der Myofibrillen und einer konsekutiven Zellverkürzung. Die Kardiomyozyten verkürzen sich durchschnittlich auf 40% ihrer endischämischen Länge. In Anwesenheit von Cyclosporin A, Ru 360 oder Ryanodin wurde die Kontraktur signifikant reduziert (Abbildung 5).

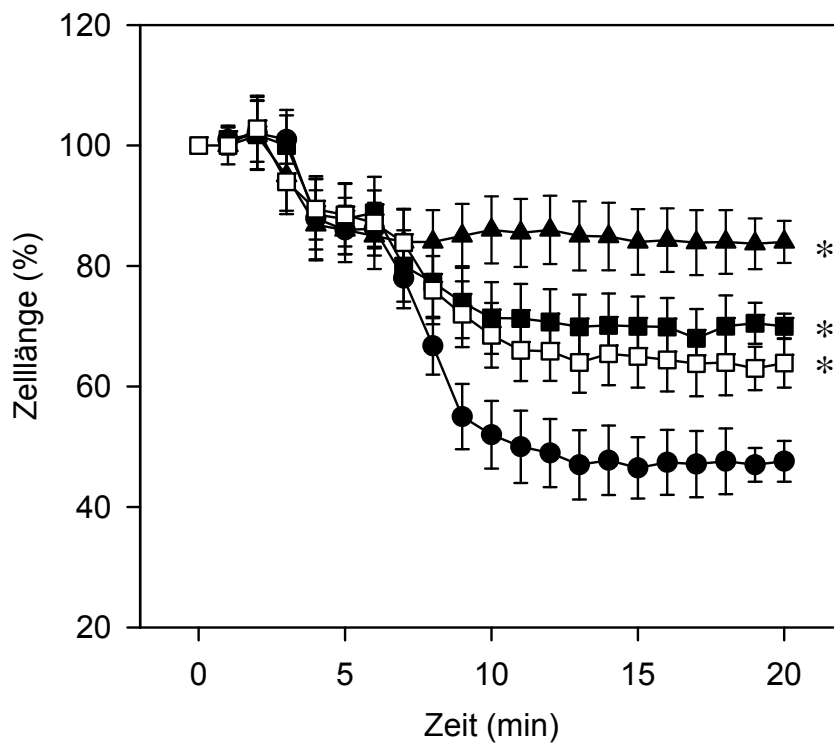


Abbildung 5:

Zeitverlauf der Zelllänge (% der endischämischen Länge) während der Reperfusion nach einer 80-minütigen Ischämiephase unter Kontrollbedingungen (●), in Anwesenheit von 3 μ M Ryanodin (▲), 10 μ M Ru 360 (■), oder 0,5 μ M Cyclosporin A (□). Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM, $n \geq 60$ Zellen von 5 unterschiedlichen Präparationen je Bedingung; * $p < 0.05$ vs. Kontrollbedingungen.

5. Diskussion

Am Modell isolierter Kardiomyozyten wurden in dieser Studie die Ursachen und Auswirkungen einer MPTP-Öffnung unter Ischämie und Reperusionsbedingungen untersucht.

Die Hauptbefunde unserer Studie sind:

- Die MPTP-Öffnung in den Kardiomyozyten findet nicht während der Ischämie, sondern in den ersten Minuten der Reperfusion statt.
- Die MPTP-Öffnung ist auf eine sekundäre mitochondriale Ca^{2+} -Überladung zurückzuführen.
- Die sekundäre mitochondriale Ca^{2+} -Überladung wird durch die Ca^{2+} -Oszillationen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum verursacht.
- Die MPTP-Öffnung führt durch Interaktionen mit dem sarkoplasmatischen Retikulum zu einer Verstärkung der zytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen und demzufolge zur Hyperkontraktur reperfundierter Kardiomyozyten.

Die Wiederversorgung des Myokard mit Sauerstoff nach einer ischämischen Phase um eine Infarzierung zu verhindern, kann in den ersten Minuten der Reperfusion zum Zelltod in Form von Nekrose führen. Das pathologische Merkmal der reperfusionsinduzierten Schäden ist das Vorhandensein von Kontraktionsbandsnekrosen, die die Hyperkontraktur reperfundierter Kardiomyozyten widerspiegelt (Garcia-Dorado et al. 1992, Miyazaki et al. 1987, Rodriguez-Sinovas et al. 2007). Die Hyperkontraktur in den ersten Minuten der Reperfusion ist energieabhängig, die Reperfusion führt zu Wiederversorgung der Zellen mit Sauerstoff und als Folge zur Produktion von ATP, die Aktin- und Myosinfilamente reagieren aufgrund der hohen zytosolischen Calcium-Konzentration mit einer starken Kontraktur (Hyperkontraktur). Die Hemmung des kontraktiven Apparates führt deswegen zur Verminderung dieser Hyperkontraktur und als Folge zu einer Reduktion der Infarktgröße (Sumida et al. 2005, Tani et al. 1996)

Wir haben in früheren Studien den Mechanismus der durch die Reperfusion entstehenden Hyperkontraktur auf zellulärer Ebene im Detail analysiert. In diesen Studien haben wir festgestellt, dass die Ca^{2+} -Oszillationen und die damit

verbundenen starken transienten Erhöhungen der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration eine bedeutende Rolle bei der Entstehung der reperfusionsinduzierten Hyperkontraktur der Kardiomyozyten spielen (Abdalla et al. 2013, Wei et al. 2007). Eine Hemmung der Ca^{2+} -Aufnahme bzw. -Freisetzung am sarkoplasmatischen Retikulum führt zur Reduktion dieser Ca^{2+} -Oszillationen und schützt somit die reperfundierten Kardiomyozyten gegen eine Hyperkontraktur (Abdallah et al. 2005, 2006, Piper et al. 2006). Die Hyperkontraktur stellt den wichtigsten Mechanismus der Myokardschädigung während der Reperfusion dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der MPTP-Öffnung, die in den ersten 5-10 Minuten der Reperfusion stattfindet, für die Entstehung der reperfusionsinduzierte Hyperkontraktur untersucht. Auslöser für die MPTP-Öffnung sind die primär durch das sarkoplasmatische Retikulum entstehenden Ca^{2+} -Oszillationen, die in den benachbarten Mitochondrien zu einem Anstieg der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration führen.

Die MPTP-Öffnung wurde mit zwei unabhängigen Methoden untersucht. Erstens wurde der mitochondriale Calceinverlust als Maß für die Integrität der mitochondrialen Membran während der Ischämie und Reperfusion analysiert. Diese Methode wurde bereits zur MPTP-Öffnung von Petronilli et al. 1999 etabliert.

Während der Ischämie wurde kein signifikanter Calceinverlust beobachtet. Das bedeutet dass die Mitochondrien ihre Membranintegrität noch erhalten haben. In der frühen Reperfusionsphase hingegen konnte ein beträchtlicher Verlust des mitochondrialen Calceins festgestellt werden, gleichbedeutend mit einer Permeabilitätszunahme der mitochondrialen Membran für Moleküle bis 1,5 kD (Abb. 1A). Die Sensitivität des Calceinverlustes zum MPTP-Inhibitor deutet daraufhin, dass der Calceinverlust durch MPTP-Öffnung zustande kommt.

In Arbeiten von Kong et al. 2010 und Kakinuma et al. 2000 wurde CoCl_2 als chemische Hypoxie zur Induktion von Apoptose in isolierten Kardiomyozyten verwendet. In diesen Arbeiten wurden die Zellen für 12-72 Stunden inkubiert. In unserem Model wurde CoCl_2 nur kurzzeitig in der Ischämie- und Reperfusionsphase für 2 Stunden verwendet.

Zweitens haben wir den Verlauf des mitochondrialen Membranpotenzials mittels JC-1 untersucht. Diese Methode zeigt die Intaktheit der Funktion der Mitochondrien.

Unter physiologischen Bedingungen haben die Mitochondrien ein negatives Membranpotential bis -180 mV , das durch den aktiven Elektronentransport entlang der Komplexe der Atmungskette entsteht und die treibende Kraft für die ATP-Synthese darstellt (Maack et al. 2006, Maack et O'Rourke 2007). Während der Ischämie kommt es zu einer mitochondrialen Depolarisation. Diese Depolarisation ist jedoch als Folge des Substratsmangels während der Ischämie zu betrachten und ist in der Regel reversibel. Bei zu langer Ischämiezeit kann jedoch eine irreversible Depolarisation der Mitochondrien aufgrund starker morphologischer Schädigung der Mitochondrien entstehen. In der vorliegenden Arbeit kommt es zur transienten Repolarisation in den ersten Minuten der Reperfusion bzw. Erholung des mitochondrialen Membranpotentials, der von einer irreversiblen Depolarisation gefolgt ist. Dies bedeutet, dass die Mitochondrien in der Ischämiephase noch nicht irreversibel geschädigt sind. Da der MPTP-Inhibitor Cyclosporin A den reperfusionsinduzierten Kollaps des mitochondrialen Membranpotentials verhindert, ist es naheliegend, dass dieser Kollaps auf eine MPTP-Öffnung zurückzuführen ist.

Als nächstes wurde die Ursache der MPTP-Öffnung in der Reperfusion untersucht. Durch die enge Nachbarschaft zwischen den Mitochondrien und dem sarkoplasmatischen Retikulum und die Tatsache, dass eine mitochondriale Ca^{2+} -Überladung eine MPTP-Öffnung induzieren kann, ist die Hypothese dieser Arbeit, dass die Ca^{2+} -Oszillationen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum für die MPTP-Öffnung ursächlich sind.

Unter physiologischen Bedingungen sind die Mitochondrien in der Lage Ca^{2+} aus dem Zytosol aufzunehmen, und damit als intrazellulärer Ca^{2+} -Puffer zu dienen. In den arbeitenden Kardiomyozyten ist eine moderate Ca^{2+} -Erhöhung in den Mitochondrien von Vorteil, da dies zur Aktivierung von zahlreichen Enzymen der Atmungskette und dadurch zur verbesserten Bereitstellung von ATP für den kontraktilem Aparat führt (Maack et al. 2006, Maack und O'Rourke 2007). Kommt es jedoch zu einer überschießend starken Erhöhung des mitochondrialen Ca^{2+} , so bindet Ca^{2+} an das mitochondriale Matrix-Protein Cyclophilin D und leitet dadurch die Öffnung von MPTP ein.

Als nächstes wurde der Mechanismus, der die MPTP-Öffnung verursacht, analysiert. Da eine mitochondriale Ca^{2+} -Überladung einer der wichtigsten

Stimulantien für die MPTP-Öffnung darstellt (Halestrap et al. 2004), wurde die mitochondriale Ca^{2+} -Beladung mit einem modifizierten Fura-2-Protokoll untersucht.

In diesem Protokoll wurde das zytosolische Fura-2-Signal mit Mangan ausgelöscht, da Mangan die mitochondriale Membran nicht durchdringen kann. Eine Studie von Gao et al. (2011) zeigte, dass Mangan zu einer Überexpression des mitochondrialen antioxidativen Proteins Mangan-Superoxiddismutase (MnSOD) führt. Dieses Protein schützt die Zellen gegen die reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS), die im zellulären Stresszustand in den Mitochondrien produziert werden und zum Zelltod beitragen (Flesch et al. 1999). Mangan reguliert MnSOD Expression nicht nur auf transkriptioneller Ebene, sondern auch auf translatorische und / oder posttranslatorische Ebene. Wir haben die Zellen 15 Minuten mit Mangan inkubiert. Die relativ kürzere Inkubationszeit unserer Kardiomyozyten mit Mangan dürfte keinen Einfluss auf die Expression von MnSOD haben.

In der frühen Phase der Reperfusion konnten wir so die Entwicklung einer mitochondrialen Ca^{2+} -Überladung feststellen, die zeitlich mit den zytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen zusammenfällt. Diese mitochondriale Ca^{2+} -Überladung blieb aus bei Hemmung des Ca^{2+} -Freisetzungskanals aus dem sarkoplasmatischen Retikulum oder bei Inhibierung der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme durch den mitochondrialen Calcium Uniporter (MCU). Dies deutet daraufhin, dass die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum die primäre Ursache für die mitochondriale Ca^{2+} -Überladung darstellt und dass der MCU eine Hauptroute für die mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme darstellt.

In Anwesenheit vom spezifischen MPTP-Hemmer Cyclosporin A stieg die mitochondriale Ca^{2+} -Konzentration in den ersten 5-10 Minuten der Reperfusion zwar vorübergehend an, aber sie fiel danach ebenfalls zum Ausgangsniveau am Versuchsbeginn ab. Die Erholung der mitochondrialen Ca^{2+} -Überladung kommt vermutlich durch eine Aktivierung des mitochondrialen Na^+ - Ca^{2+} -Austauschers (mNCE) zustande (Maack et al 2006, Ruiz-Meana et al. 2010). Dabei wird Ca^{2+} aus den Mitochondrien gegen das zytosolische Na^+ ausgetauscht. Natriumionen werden dann durch Aktivierung des Na^+ - H^+ -Austauschers aus den Mitochondrien entfernt. Dieser Vorgang setzt in der Regel ein energetisch kompetentes Mitochondrium voraus, welches den Protonengradienten aktiv aufrechterhalten kann. Dieser Prozess tritt wahrscheinlich in Anwesenheit von Ryanodin, Ru 360 und Cyclosporin A ein, da die Anwesenheit dieser Inhibitoren zu einer Erholung des mitochondrialen

Membranpotentials führt und somit die funktionelle Integrität der Mitochondrien gewährleistet.

Die Analyse der zytosolischen Ca^{2+} -Kinetik zeigt, dass die Ca^{2+} -Oszillationen, die unter Kontrollbedingungen auftreten, in Anwesenheit von Ryanodin völlig aufgehoben wurden. Von großer Bedeutung war der Befund, dass die Hemmung der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme mit Ru 360 oder der MPTP-Öffnung mit Cyclosporin A ebenfalls zur signifikanten Reduktion der Ca^{2+} -Oszillationen führte. Die Reduktion der Frequenz der Ca^{2+} -Oszillationen durch die Behandlung mit diesen mitochondrialen Inhibitoren deutet auf eine mitochondriale Beteiligung an der Aufrechterhaltung der zytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen durch eine Interaktion zwischen dem sarkoplasmatischen Retikulum und den Mitochondrien hin. Die Inhibition des SR- Ca^{2+} -Freisetzung-Kanals (RyR) führt zur nahezu völligen Aufhebung der Ca^{2+} -Oszillationen (Ruiz-Meana et al. 2009). Das bedeutet, dass die Ca^{2+} -Oszillationen primär am sarkoplasmatischen Retikulum entstehen und die dadurch entstehende mitochondriale Dysfunktion (MPTP-Öffnung) zur Verstärkung dieser Ca^{2+} -Oszillationen führt (Abb. 6). Diese Interaktion kann allerdings nur entstehen, wenn in der Zelle nicht alle Mitochondrien gleichzeitig eine MPTP-Öffnung aufweisen, da in einem solchen Falle die Energie für die sarkoplasmatische Ca^{2+} -Aufnahme nicht bereitgestellt werden kann. Die Kinetik der Freisetzung von Calcium aus den Mitochondrien sowie das Abfallen des Membranpotentials zeigen im Durchschnitt über alle Mitochondrien einen über 5-10 Minuten gestreckten Verlauf. Es ist zu vermuten, dass sich hierin eine stark zeitliche Heterogenität der MPTP-Öffnung der einzelnen Mitochondrien einer Zelle widerspiegelt. Dann wäre während dieser Phase der Reperfusion ein Teil der Mitochondrien noch in der Lage ATP oxidativ zu generieren, während ein anderer Teil bereits seine MPTP öffnet.

Nicht überraschend ist der Befund, dass die Reduktion der Ca^{2+} -Oszillationen in Anwesenheit von Inhibitoren des sarkoplasmatischen Retikulums (Ryanodin) oder der Mitochondrien (Cyclosporin A und Ru 360) zur Reduktion der Hyperkontraktur führt. Die kausale Rolle der Ca^{2+} -Oszillationen für die Hyperkontraktur beruht auf einer überschießenden Ca^{2+} -vermittelten Aktivierung des kontraktile Apparates der Kardiomyozyten in der Reperfusion (Abdallah et al. 2011, Siegmund et al. 1997).

Die Hauptbefunde unserer Studie sind in Abbildung 6 schematisch zusammengefasst. Das in den ersten Minuten der Reperfusion gebildete ATP wird durch die Ca^{2+} -Pumpe des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA) verbraucht.

Diese wird in Anwesenheit von ATP bei einer zytosolischen Ca^{2+} -Überladung aktiviert und nimmt Ca^{2+} aktiv ins SR auf. Dieser Vorgang führt zu einer Ca^{2+} -Überladung im sarkoplasmatischen Retikulum mit der Folge einer Aktivierung des Ca^{2+} -Freisetzungskanals im gleichen Organell. Das freigesetzte Ca^{2+} gelangt ins Zytosol zurück und wird dann wieder von der SERCA ins SR aufgenommen. Die resultierende repetitive Erhöhung des zytosolischen Ca^{2+} (Ca^{2+} -Oszillationen) in der Nähe der Mitochondrien führt zur mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme durch den mitochondrialen Transporter (MCU). Wenn die mitochondriale Ca^{2+} -Konzentration eine bestimmte Schwelle erreicht, öffnen sich die MPTP, das Ca^{2+} strömt ins Zytosol und führt zur erneuten Ca^{2+} -Überladung des Zytosols und damit wieder zur Aktivierung der Ca^{2+} -Aufnahme ins sarkoplasmatische Retikulum. In Anwesenheit von Inhibitoren der SR- Ca^{2+} -Freisetzung bzw. der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme ist der Ca^{2+} -Austausch zwischen dem SR und den Mitochondrien über das Zytosol unterbrochen. Die daraus resultierenden Ca^{2+} -Oszillationen sind reduziert, das führt auf der anderen Seite zur Abmilderung der Hyperkontraktur der Kardiomyozyten.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass es ein Zusammenspiel zwischen der SR-abhängigen Ca^{2+} -Kinetik und den MPTP gibt. Beide stellen wichtige Faktoren für die reperfusionsinduzierten Mechanismen, die zur Hyperkontraktur und zu einem darauffolgenden nekrotischen Zelltod führen.

Der klinische Ausblick

Der Herzinfarkt ist ein akutes und lebensbedrohliches Ereignis infolge einer Herzerkrankung, in den meisten Fällen durch Blutgerinnsel in einer arteriosklerotisch veränderten Engstelle eines Herzkranzgefäßes. Der Herzinfarkt führt aufgrund einer Durchblutungsstörung in Form von Ischämie zum Absterben von Teilen des Herzmuskels. Da die Reperfusionstherapie (Wiederversorgung der Herzmuskelzellen mit Sauerstoff) die Morbidität und Mortalität der STEMI-Patienten (ST-Elevation Myocardial Infarction) deutlich senkt, sollte man bei allen Patienten mit STEMI so rasch wie möglich eine Reperfusionstherapie durchführen (Antman et al. 2007). Die Reperfusion kann nach einer langen Ischämie-Phase ohne pharmakologische Intervention die Kardiomyozyten schädigen (Hyperkontraktur), deswegen haben wir

die Ursachen der Hyperkontraktur und die Therapiemöglichkeiten zur Verminderung dieser Schäden der Kardiomyozyten untersucht.

Die vorliegende Arbeit identifiziert zwei mögliche therapeutische Ziele: die Organellen SR und Mitochondrien, die bezüglich der Auslösung myofibrillärer Hyperkontraktur gegenseitig verstärkend interagieren. Erste klinische Studien haben bereits Hinweise erbracht, dass die Hemmung der MPTP-Öffnung in der Frühphase der myokardialen Reperfusion die Folgen eines akuten Myokardinfarktes abmildern kann (Piot et al. 2008). Die Kenntnis der Interaktion von SR und Mitochondrien bietet zusätzliche therapeutische Eingriffsmöglichkeiten an. Eine Unterbrechung des Zusammenspiels zwischen den beiden zellulären Organellen kann neue Behandlungsmöglichkeiten bieten, um die Kardiomyozyten vor dem Reperusionsinduzierten Schaden zu schützen, z.B. die Inhibierung des SR- Ca^{2+} -Freisetzungskanals (Ryanodin-Rezeptor), oder des mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme-Transporters (MCU).

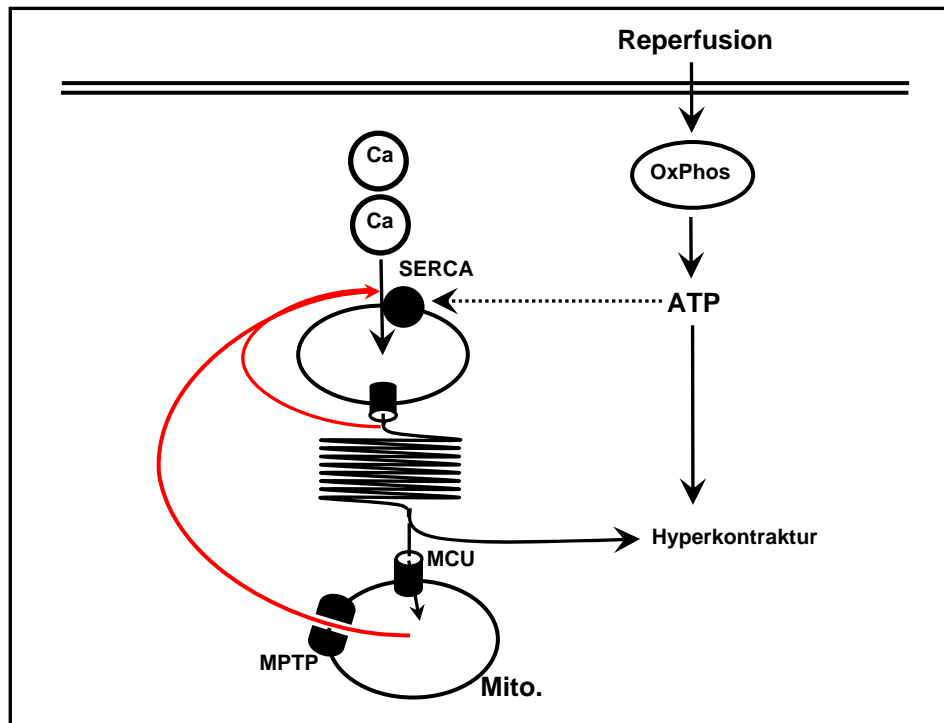


Abbildung 6: Schematische Darstellung der SR-induzierten mitochondrialen Dysfunktion während der Reperfusion.

6. Zusammenfassung

Zahlreiche Arbeiten zeigen, dass die MPTP eine wichtige Rolle für die Entstehung des myokardialen Reperfusionsschadens spielt. In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass Ca^{2+} -Oszillationen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) eine wichtige Rolle für die reperfusionsinduzierte Hyperkontraktur und Nekrose der Herzmuskelzellen spielt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist zu klären, ob und wann eine MPTP-Öffnung während der Ischämie und Reperfusion stattfindet, welche Rolle die sarkoplasmatisch abhängigen Ca^{2+} -Oszillationen und die MPTP-Öffnung bei der Entwicklung der Hyperkontraktur spielen, und ob der Verlust der mitochondrialen Ca^{2+} -Sequestrierung bei der MPTP-Öffnung die SR-abhängigen Ca^{2+} -Oszillationen verstärkt.

Unsere Untersuchungen haben wir an isolierten Herzmuskelzellen adulter Wistar Ratten in vitro durchgeführt. Die Zellen wurden mit Fluoreszenz-Indikatoren vorinkubiert, um die zytosolische und mitochondriale Calcium-Homöostase sowie die MPTP-Öffnung zu identifizieren. Zur Bestimmung der Ca^{2+} -Homöostase wurden die Zellen mit Fura-2 AM beladen. Zur Untersuchung der MPTP-Öffnung haben wir die Zellen mit Calcein-AM oder mit JC-1 beladen. Die Kardiomyozyten wurden mit einer physiologischen Lösung perfundiert, dann wurden sie 90 Minuten lang einer ischämischen Phase (Anoxie) unterzogen, die von einer Reperfusionsphase (Reoxygenation) gefolgt wurde. In der Reperfusionsphase wurden Inhibitoren der MPTP (Cyclosporin A) oder SR- Ca^{2+} -Freisetzung (Ryanodin) oder mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme (Ru 360) appliziert.

Unter Kontrollbedingungen kommt es zu einem irreversiblen Verlust der mitochondrialen Calceinkonzentration und einem irreversiblen Kollaps des mitochondrialen Membranpotentials. Die Behandlung der Kardiomyozyten mit Cyclosporin A, Ru 360 oder Ryanodin in der Reperfusionsphase führt zu signifikant geringerem Calceinverlust und verhindert den Kollaps des mitochondrialen Membranpotentials. Die mitochondriale Calciumkonzentration steigt in der Ischämie an. Mit Beginn der Reperfusion kommt es zu einem irreversiblen Anstieg. Die Behandlung mit Cyclosporin A, Ru 360 oder Ryanodin in der Reperfusionsphase führt zur Erholung der mitochondrialen Calciumkonzentration. Die Zellen entwickeln in der Reperfusionsphase unter Kontrollbedingungen Ca^{2+} -Oszillationen und Hyperkontraktur, die durch die Behandlung mit Ryanodin, Ru 360 oder Cyclosporin A signifikant verringert wurden.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass die MPTP-Öffnung in der frühen Phase der Reperfusion, d.h. bereits in den ersten Minuten stattfindet. Die MPTP-Öffnung ist auf eine mitochondriale Ca^{2+} -Überladung zurückzuführen, die durch zytosolische Ca^{2+} -Oszillationen ausgelöst wird, welche wiederum durch eine primäre Ca^{2+} -Aufnahme ins sarkoplasmatische Retikulum verursacht werden. Die MPTP-Öffnung führt durch Interaktion mit dem sarkoplasmatischen Retikulum zu einer Verstärkung der zytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen.

7. Summary

Several studies showed that the mitochondrial permeability transition pores play an important role in the development of a myocardial reperfusion injury. We have already shown that Ca^{2+} -oscillation depending on the sarcoplasmic reticulum (SR) plays an important role in the development of the hypercontraction and nekrosis of the cardiomyocytes. The aim of the present study is to investigate whether and when do mitochondrial permeability transition pores opening occur during ischemia and reperfusion. The focus of the study was the role of the Ca^{2+} -oscillations in the development of the hypercontracture and MPTP opening and if a loss of mitochondrial Ca^{2+} through MPTP opening reinforce the SR dependent Ca^{2+} -oscillations.

The experiments were done in isolated cardiomyocytes of adult 200-300 g Wistar rats in vitro. To determine the cytosolic or mitochondrial Ca^{2+} -concentration, we loaded the cells with Fura-2 AM. To investigate the opening of MPTP we loaded the cells with Calcein-AM or JC-1. The cardiomyocytes were perfused with physiological solution and then they were subjected to 90 minutes ischemic phase (anoxia) which was followed by reperfusion phase (reoxygenation).

The inhibitors of MPTP (Cyclosporin A) or SR- Ca^{2+} -release (Ryanodin) or mitochondrial Ca^{2+} uptake (Ru 360) were applied during reperfusion

Under control conditions the cardiomyocytes show an irreversible loss of mitochondrial calcein concentration and an irreversible collapse of mitochondrial membrane potential. Treatment of cardiomyocytes with cyclosporine A, Ru 360 or ryanodine during reperfusion prevents mitochondrial calcein loss and improves recovery of mitochondrial membrane potential. During ischemia, mitochondrial calcium concentration rises. In early reperfusion a further irreversible increase in mitochondrial calcium occurs. Treatment with cyclosporine A, Ru 360 or ryanodine during reperfusion leads to a complete recovery of mitochondrial calcium concentration. In early reperfusion cardiomyocytes develop Ca^{2+} -oscillations and hypercontracture. These were significantly reduced by treatment with ryanodine, Ru 360 or cyclosporin A.

The major findings of the study are that mitochondrial permeability transition pores open in the early reperfusion phase, i.e. within the first minutes of the reperfusion. The MPTP opening occurs due to a mitochondrial Ca^{2+} -overload that is

triggered by the Ca^{2+} -oscillations originating from the sarcoplasmic reticulum. The MPTP opening is a part of an interaction between sarcoplasmic reticulum and mitochondria reinforcing the cytosolic Ca^{2+} -oscillations.

8. Literatur

Abdallah Y, Gkatzoflia A, Pieper H, Zoga E, Walther S, Kasseckert S, Schäfer M, Schlüter KD, Piper HM, Schäfer C (2005)

Mechanism of cGMP-mediated protection in a cellular model of myocardial reperfusion injury.

Cardiovasc Res 66:123-131

Abdallah Y, Gkatzoflia A, Gligorievski D, Kasseckert S, Euler G, Schlüter KD, Schäfer M, Piper HM, Schäfer C (2006)

Insulin protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture by a survival pathway targeting SR Ca^{2+} storage.

Cardiovasc Res 70:346-353

Abdallah Y, Kasseckert SA, Iraqi W, Said M, Shahzad T, Erdogan A, Neuhofer C, Gündüz D, Schlüter KD, Tillmanns H, Piper HM, Reusch HP, Ladilov Y (2011)

Interplay between Ca^{2+} cycling and mitochondrial permeability transition pores promotes reperfusion-induced injury of cardiac myocytes.

J Cell Mol Med 15:2478-85

Allshire A, Piper HM, Cuthbertson KS, Cobbold PH (1987)

Cytosolic free Ca^{2+} in single rat heart cells during anoxia and reoxygenation.

Biochem J 244:381-5

Antman EM, Hand M, Armstrong PW, Bates ER, Green LA, Halasyamani LK, Hochman JS, Krumholz HM, Lamas GA, Mullany CJ, Pearle DL, Sloan MA, Smith SC Jr; 2004 Writing Committee Members, Anbe DT, Kushner FG, Ornato JP, Jacobs AK, Adams CD, Anderson JL, Buller CE, Creager MA, Ettinger SM, Halperin JL, Hunt SA, Lytle BW, Nishimura R, Page RL, Riegel B, Tarkington LG, Yancy CW (2007)

2007 Focused Update of the ACC/AHA 2004 Guidelines for the Management of Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction: a report of the American

College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration With the Canadian Cardiovascular Society endorsed by the American Academy of Family Physicians: 2007 Writing Group to Review New Evidence and Update the ACC/AHA 2004 Guidelines for the Management of Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction, Writing on Behalf of the 2004 Writing Committee.
Circulation 117:296-329

Argaud L, Gateau-Roesch O, Raisky O, Loufouat J, Robert D, Ovize M (2005)
Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition.
Circulation 111:194-7

Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, Brunskill EW, Sayen MR, Gottlieb RA, Dorn GW, Robbins J, Molkentin JD (2005)
Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death.
Nature 434:658-62

Barrabés JA, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Piper HM, Solares J, González MA, Oliveras J, Herrejón MP, Soler Soler J (1996)
Myocardial segment shrinkage during coronary reperfusion in situ. Relation to hypercontracture and myocardial necrosis.
Pflugers Arch 43:519-26

Dennis SC, Gevers W, Opie LH (1991)
Protons in Ischemia: Where do they come from; where do they go to?
J Mol Cell Cardiol 23:1077-1086

Duchen MR, Leyssens A, Crompton M (1998)
Transient mitochondrial depolarizations reflect focal sarcoplasmic reticular calcium release in single rat cardiomyocytes.
J Cell Biol 142:975-88

Fidelman ML, Seeholzer SH, Walsh KB, Moore RD (1982)

Intracellular pH mediates action of insulin on glycolysis in frog skeletal muscle.

Am J Physiol 242:C87-93

Flesch M, Maack C, Cremers B, BäumerAT, Südkamp M, Böhm M (1999)

Effect of betablockers on free radical-induced cardiac contractile dysfunction.

Circulation 100:346-53

Frelin C, Vigne P, Lazdunski M (1985)

The role of the Na⁺/H⁺ exchange system in the regulation of the internal pH in cultured cardiac cells.

Eur J Biochem 149:1-4

Ganote CE (1983)

Contraction bands necrosis and irreversible myocardial injury.

J Mol Cell Cardiol 15:67-73

Gao T, Wang F, Li S, Luo X, Zhang K (2011)

Manganese regulates manganese-containing superoxide dismutase (MnSOD) expression in the primary broiler myocardial cells.

Biol Trace Elem Res 144:695-704

Garcia-Dorado D, Theroux P, Duran JM, Solares J, Alonso J, Sanz E, Munoz R, Elizaga J, Botas J, Fernandez-Aviles F (1992)

Selective inhibition of the contractile apparatus: a new approach to modification of infarct size, infarct composition, and infarct geometry during coronary artery occlusion and reperfusion.

Circulation 85:1160-74

Garcia-Dorado D (2004)

Myocardial reperfusion injury: a new view.

Cardiovasc Res 61:363-4

Gateau-Roesch O, Argaud L, Ovize M (2006)

Mitochondrial permeability transition pore and postconditioning.

Cardiovasc Res 70:264-73

Halestrap AP, McStay GP, Clarke SJ (2002)

The permeability transition pore complex: another view.

Biochimie 84:153-66

Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA (2004)

Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection.

Cardiovasc Res 61:372-85

Halestrap AP, Clarke SJ, Khaliulin I (2007)

The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning.

Biochim Biophys Acta 1767:1007-31

Hausenloy DJ, Duchen MR, Yellon DM (2003)

Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia-reperfusion injury.

Cardiovasc Res 60:617-25

Hendriks M, Mubagwa K, Verdonck F, Overloop K, Van Hecke P, Vanstapel F, Van Lommel A, Verbeken E, Lauweryns J, Flameng W (1994)

New Na(+)-H⁺ exchange inhibitor HOE 694 improves postischemic function and high-energy phosphate resynthesis and reduces Ca²⁺ overload in isolated perfused rabbit heart.

Circulation 89:2787-98

Inserte J, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Padilla F, Barrabés JA, Pina P, Agulló L, Piper HM, Soler-Soler J (2002)

Effect of inhibition of Na⁺/Ca²⁺ exchanger at the time of myocardial reperfusion on hypercontracture and cell death.

Cardiovasc Res 55:739-748

Kakinuma Y, Miyauchi T, Yuki K, Murakoshi N, Goto K, Yamaguchi I (2000)
Mitochondrial dysfunction of cardiomyocytes causing impairment of cellular energy metabolism induces apoptosis, and concomitant increase in cardiac endothelin-1 expression.
J Cardiovasc Pharmacol 36:S201-4

Kong HL, Li ZQ, Zhao YJ, Zhao SM, Zhu L, Li T, Fu Y, Li HJ (2010)
Ginsenoside Rb1 protects cardiomyocytes against CoCl₂-induced apoptosis in neonatal rats by inhibiting mitochondria permeability transition pore opening.
Acta Pharmacol Sin 31:687-95

Leung AW, Halestrap AP (2008)
Recent progress in elucidating the molecular mechanism of the mitochondrial permeability transition pore.
Biochim Biophys Acta 1777:946-52

Maack C, Cortassa S, Aon MA, Ganesan AN, Liu T, O'Rourke B (2006)
Elevated cytosolic Na⁺ decreases mitochondrial Ca²⁺ uptake during excitation-contraction coupling and impairs energetic adaptation in cardiac myocytes.
Circ Res 99:172-82

Maack C, O'Rourke B (2007)
Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics.
Basic Res Cardiol 102:369-92

Miyazaki S, Fujiwara H, Onodera T, Kihara Y, Matsuda M, Wu DJ, Nakamura Y, Kumada T, Sasayama S, Kawai C, et al. (1987)
Quantitative analysis of contraction band and coagulation necrosis after ischemia and reperfusion in the porcine heart.
Circulation 75:1074-82

Moriguchi A, Otani H, Yoshioka K, Shimazu T, Fujita M, Okazaki T, Sato D, Kyo S, Iwasaka T (2010)

Inhibition of contractile activity during postconditioning enhances cardioprotection by restoring sarcolemmal dystrophin through phosphatidylinositol 3-kinase.

Circ J 74:2393-402

Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, Inohara H, Kubo T, Tsujimoto Y (2005)

Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death.

Nature 434:652-8

Owens LM, Fralix TA, Murphy E, Cascio WE, Gettes LS (1996)

Correlation of ischemia-induced extracellular and intracellular ion changes to cell-to-cell electrical uncoupling in isolated blood-perfused rapid hearts. Experimental Working Group.

Circulation 94:10-13

Petronilli V, Miotto G, Canton M, Brini M, Colonna R, Bernardi P, Di Lisa F (1999)

Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence.

Biophys J 76:725-34

Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, Elbelghiti R, Cung TT, Bonnefoy E, Angoulvant D, Macia C, Raczka F, Sportouch C, Gahide G, Finet G, André-Fouët X, Revel D, Kirkorian G, Monassier JP, Derumeaux G, Ovize M (2008)

Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction.

N Engl J Med 359:473-81

Piper HM, Probst I, Schwartz P, Hutter FJ, Spiekermann PG (1982)

Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes.

J Mol Cell Cardiol 14:397-412

Piper HM (1989)

Energy deficiency, calcium overload or oxidative stress: possible causes of irreversible ischemic myocardial injury.

Klin Wochenschr 67:465-76

Piper HM, Abdallah Y, Schäfer C (2004)

The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection.

Cardiovasc Res 61:365-3671

Piper HM, Kasseckert S, Abdallah Y (2006)

The sarcoplasmic reticulum as the primary target of reperfusion protection.

Cardiovasc Res 70:170-3

Piper HM, Kasseckert SA, Schlüter KD, Abdallah Y (2008)

Pathophysiologie des myokardialen Reperfusionsschaden.

Dtsch Med Wochenschr 133:586-90

Rodriguez-Sinovas A, Abdallah Y, Piper HM, Garcia-Dorado D (2007)

Reperfusion injury as a therapeutic challenge in patients with acute myocardial infarction.

Heart Fail Rev 12:207-216

Ruiz-Meana M, Abellán A, Miró-Casas E, Agulló E, Garcia-Dorado D (2009)

Role of sarcoplasmic reticulum in mitochondrial permeability transition and cardiomyocyte death during reperfusion.

Am J Physiol Heart Circ Physiol 297:H1281-9

Ruiz-Meana M, Fernandez-Sanz C, Garcia-Dorado D (2010)

The SR-mitochondrial interaction: a new player in cardiac pathophysiology.

Cardiovasc Res 88:30-9

Schäfer C, Ladilov Y, Inserte J, Schäfer M, Haffner S, Garcia-Dorado D, Piper HM (2001)

Role of the reverse mode of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury.

Cardiovasc Res 51:241-50

Shahzad T, Kasseckert SA, Iraqi W, Johnson V, Schulz R, Schlüter KD, Dörr O, Parahuleva M, Hamm C, Ladilov Y Abdallah Y (2013)

Mechanisms involved in postconditioning protection of cardiomyocytes against acute reperfusion injury.

J Mol Cell Cardiol 58:209-16

Siegmund B, Klietz T, Schwartz P, Piper HM (1991)

Temporary contractile blockade prevents hypercontracture in anoxic-reoxygenated cardiomyocytes.

Am J Physiol 260:H426-35

Siegmund-B; Schluter-KD; Piper-HM (1993)

Calcium and the oxygen paradox.

Cardiovasc-Res 27:1778-83

Siegmund B, Schlack W, Ladilov YV, Balser C, Piper HM (1997)

Halothan protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture.

Circulation 96:4372-4379

Skyschally A, Schulz R, Heusch G (2008)

Pathophysiology of myocardial infarction: protection by ischemic pre- and postconditioning.

Herz 33:88-100

Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L'Huillier I, Aupetit JF, Bonnefoy E, Finet G, André-Fouët X, Ovize M (2005)

Postconditioning the human heart.

Circulation 112:2143-8

Sumida T, Otani H, Kyo S, Okada T, Fujiwara H, Nakao Y, Kido M, Imamura H (2005)

Temporary blockade of contractility during reperfusion elicits a cardioprotective effect of the p38 MAP kinase inhibitor SB-203580.

Am J Physiol Heart Circ Physiol 288:H2726-34

Szalai G, Csordás G, Hantash BM, Thomas AP, Hajnóczy G (2000)

Calcium signal transmission between ryanodine receptors and mitochondria.

J Biol Chem 275:15305-13

Tani M, Hasegawa H, Suganuma Y, Shinmura K, Kayashi Y, Nakamura Y (1996)

Protection of ischemic myocardium by inhibition of contracture in isolated rat heart.

Am J Physiol 271:H2515-9

Thibault H, Piot C, Staat P, Bontemps L, Sportouch C, Rioufol G, Cung TT, Bonnefoy E, Angoulvant D, Aupetit JF, Finet G, André-Fouët X, Macia JC, Raczka F, Rossi R, Itti R, Kirkorian G, Derumeaux G, Ovize M (2008)

Long-term benefit of postconditioning.

Circulation 117:1037-44

Wei GZ, Zhou JJ, Wang B, Wu F, Bi H, Wang YM, Yi DH, Yu SQ, Pei JM (2007)

Diastolic Ca²⁺ overload caused by Na⁺/Ca²⁺ exchanger during the first minutes of reperfusion results in continued myocardial stunning.

Eur J Pharmacol 572:1-11

9. Erklärung

Ich erkläre: „Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

(Maher Said)

10. Danksagung

Herrn Professor Dr. Dr. H. M. Piper danke ich für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes innerhalb des Physiologischen Institutes, für die gute Betreuung und die hilfreiche Kritik, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn PD Dr. Yaser Abdallah danke ich für die intensive Unterstützung und die engagierte Betreuung dieser Arbeit und für seine wertvollen Anregungen.

Recht herzlich möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Sascha A. Kasseckert für die zahlreichen guten Ratschläge bedanken.

Den technischen Assistenten/innen des Physiologischen Institutes, insbesondere Gudrun Pfeiffer, Daniela Schreiber und Otto Becker möchte ich für ihre Hilfe ganz herzlich danken.

Für das nette Arbeitsklima danke ich allen anderen Mitgliedern des Institutes und besonders des Calciumlabors.